

(19)日本国特許庁 (JP)

(12)公表特許公報 (A)

(11)特許出願公表番号
特表2003-507022
(P2003-507022A)

(43)公表日 平成15年2月25日 (2003.2.25)

(51) Int.Cl.⁷
(C 12 P 7/18
C 12 R 1:225)
1/19
1/21
9/04

識別記号

F I
C 12 N 1/15
1/19
1/21
9/04
C 12 P 7/18

テーマコード* (参考)
4 B 0 2 4
4 B 0 5 0
4 B 0 6 4
C 4 B 0 6 5

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 147 頁) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願2001-516920(P2001-516920)
(86) (22)出願日 平成12年8月18日(2000.8.18)
(85)翻訳文提出日 平成14年2月18日(2002.2.18)
(86)国際出願番号 PCT/US00/22874
(87)国際公開番号 WO01/012833
(87)国際公開日 平成13年2月22日(2001.2.22)
(31)優先権主張番号 60/149, 534
(32)優先日 平成11年8月18日(1999.8.18)
(33)優先権主張国 米国(US)
(81)指定国 EP(AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), BR, CA, CN, ID, IN, JP, KR, MX, SG, US

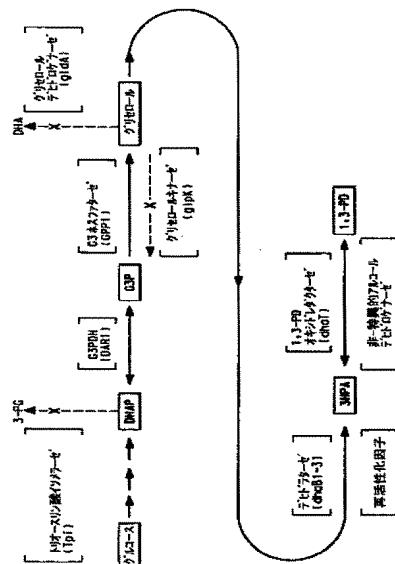
(71)出願人 イー・アイ・デュポン・ドウ・ヌムール・アンド・カンパニー
E. I. DU PONT DE NEMO
URS AND COMPANY
アメリカ合衆国、デラウェア州、ウイルミントン、マーケット・ストリート 1007
(71)出願人 ジエンヌカーナンタナショナル・インコーポレーテッド
アメリカ合衆国カリフォルニア州94304-1013パロアルト・ペイジミルロード925
(74)代理人 弁理士 小田島 平吉

最終頁に続く

(54)【発明の名称】高力価を有する1, 3-プロパンジオールの生物的生産法

(57)【要約】

本発明は1つの微生物中で発酵可能な炭素源から1, 3-プロパンジオールを生物的に生産するための改良法を提供する。本発明の1つの側面において、グルコースの1, 3-プロパンジオールへの転換のための改良法が、クレブシエラ・ニューモニアエ dhaR, orfY, dhaT, orfX, orfW, dhab1, dhab2, dhab3 及び orfZ を用いて形質転換された E. コリの使用により達成され、これらの遺伝子のすべては野生型クレブシエラ・ニューモニアエ中に見いだされると同じ遺伝子体制で配置される。本発明の他の側面において、G3PDH, G3P ホスファターゼ、デヒドラターゼ及びデヒドラターゼ再活性化因子をコードする遺伝子を含有する組換え E. コリを用い、G3PDH, G3P ホスファターゼ、デヒドラターゼ、デヒドラターゼ再活性化因子及び 1, 3-プロパンジオールオキシドレダクターゼ (dhaT) をコードする遺伝子を含有する組換え E. コリを用いる同じ方法と比較して改良されたグルコースからの 1, 3-プロパンジオールの生産のための方法を提供する。劇的



【特許請求の範囲】

【請求項1】 3-ヒドロキシプロピオナルデヒドの1, 3-プロパンジオールへの転換のための非一特異的触媒活性をコードし、且つ：

(a) 配列番号：57のアミノ酸配列のすべて又は実質的部分をコードする単離された核酸フラグメント；

(e) 配列番号：57のアミノ酸配列のすべて又は実質的部分をコードする単離された核酸フラグメントに実質的に類似している単離された核酸フラグメント；

(f) 配列番号：57のアミノ酸配列の少なくとも80%を有する少なくとも387個のアミノ酸のポリペプチドをコードする単離された核酸フラグメント；

(d) 0.1XSSC、0.1%SDS、65°Cのハイブリダイジェーション条件下で(a)とハイブリダイジェーションし、2XSSC、0.1%SDS及び繰り返して0.1XSSC、0.1%SDSを用いて洗浄された単離された核酸フラグメント；ならびに

(e) (a)、(b)、(c)又は(d)に相補的である単離された核酸フラグメント

より成る群から選ばれる単離された核酸フラグメント。

【請求項2】 配列番号：58に示される単離された核酸フラグメント。

【請求項3】 請求項1の単離された核酸フラグメントによりコードされるポリペプチド。

【請求項4】 配列番号：57に示される請求項3のポリペプチド。

【請求項5】 適した調節配列に操作可能に結合した請求項1の単離された核酸フラグメントを含むキメラ遺伝子。

【請求項6】 請求項5のキメラ遺伝子を用いて形質転換された、シトロバクテル (Cytrobacter)、エンテロバクテル (Enterobacter)、クロストリジウム (Clostridium)、クレブシエラ (Klebsiella)、アエロバクテル (Aerobacter)、ラクトバシルス (Lactobacillus)、アスペルギルス (Aspergillus)、サッカロミセス (Saccharomyces)、シゾサッカロミセス (Sc

h i z o s a c c h a r o m y c e s)、チゴサッカロミセス (Z y g o s a c c h a r o m y c e s)、ピチア (P i c h i a)、クルイベロミセス (K l u y v e r o m y c e s)、カンジダ (C a n d i d a)、ハンセヌラ (H a n s e n u l a)、デバリオミセス (D e b a r y o m y c e s)、ムコル (M u c o r)、トルロプシス (T o r u l o p s i s)、メチロバクテル (M e t h y l o b a c t e r)、サルモネラ (S a l m o n e l l a)、バシリス (B a c i l l u s)、アエロバクテル (A e r o b a c t e r)、ストレプトミセス (S t r e p t o m y c e s) 及びシュードモナス (P s e u d o m o n a s) より成る群から選ばれる微生物。

【請求項7】 (a) デヒドラターゼ活性を有するポリペプチドをコードする少なくとも1つの遺伝子；

(b) デヒドラターゼ再活性化因子をコードする少なくとも1つの遺伝子；
及び

(c) 3-ヒドロキシプロピオンアルデヒドを1, 3-プロパンジオールに転換する非一特異的触媒活性をコードする少なくとも1つの外因性遺伝子を含む1, 3-プロパンジオールの生産に有用な組換え微生物であって、1, 3-プロパンジオールオキシドレダクターゼ活性をコードする機能性d h a T遺伝子が組換え微生物中に存在せず、微生物がシトロバクテル、エンテロバクテル、クロスツリジウム、クレブシエラ、アエロバクテル、ラクトバシリス、アスペルギルス、サッカロミセス、シゾサッカロミセス、チゴサッカロミセス、ピチア、クルイベロミセス、カンジダ、ハンセヌラ、デバリオミセス、ムコル、トルロプシス、メチロバクテル、サルモネラ、バシリス、アエロバクテル、ストレプトミセス及びシュードモナスより成る群から選ばれる組換え微生物。

【請求項8】 さらに：

(a) グリセロール-3-リン酸デヒドログナーゼ活性を有するポリペプチドをコードする少なくとも1つの遺伝子；及び

(b) グリセロール-3-ホスファターゼ活性を有するポリペプチドをコードする少なくとも1つの遺伝子
を含む請求項7の組換え微生物。

【請求項 9】 デヒドラターゼ再活性化因子が d h a レギュロンから単離される o r f X 及び o r f Z によりコードされる請求項 7 又は 8 の組換え微生物。

【請求項 10】 o r f X 及び o r f Z が独立にクレブシエラ種、シトロバクテル種又はクロスツリジウム種から単離される請求項 9 の組換え微生物。

【請求項 11】 さらに、それぞれが遺伝子を不活性化する突然変異を有する 1 組の内因性遺伝子を含み、該組が：

(a) グリセロールキナーゼ活性を有するポリペプチドをコードする第 1 の遺伝子；

(b) グリセロールデヒドロゲナーゼ活性を有するポリペプチドをコードする第 2 の遺伝子；及び

(c) トリオースリン酸イソメラーゼ活性を有するポリペプチドをコードする第 3 の遺伝子

から成る請求項 8 の組換え微生物。

【請求項 12】 組換え微生物が单糖類、オリゴ糖類、多糖類及び 1-炭素 (single-carbon) 基質より成る群から選ばれる炭素源を 1, 3-プロパンジオールに転換する請求項 8 又は 11 の組換え微生物。

【請求項 13】 組換え微生物がグリセロール及びジヒドロキシアセトンより成る群から選ばれる炭素源を 1, 3-プロパンジオールに転換する請求項 7 の組換え微生物。

【請求項 14】 グリセロール-3-リン酸デヒドロゲナーゼ活性を有するポリペプチドをコードする遺伝子が G P D 1、G P D 2、G P D 3、D A R 1、g p s A、G U T 2、g l p D 及び g l p A B C より成る群から選ばれる請求項 8 又は 11 の組換え微生物。

【請求項 15】 グリセロール-3-ホスファターゼ活性を有するポリペプチドをコードする遺伝子が G P P 1 及び G P P 2 より成る群から選ばれる請求項 8 又は 11 の組換え微生物。

【請求項 16】 デヒドラターゼ活性を有するポリペプチドをコードする遺伝子がグリセロールデヒドラターゼ及びジオールデヒドラターゼより成る群から選ばれる請求項 7、8 又は 11 の組換え微生物。

【請求項 17】 デヒドラターゼ活性を有するポリペプチドをコードする遺伝子がクレブシエラ種、シトロバクテル種又はクロスツリジウム種から単離される請求項 7、8 及び 11 の組換え微生物。

【請求項 18】 (a) (i) デヒドラターゼ活性を有するポリペプチドをコードする少なくとも 1 つの遺伝子；

(i i) グリセロール-3-リン酸デヒドロゲナーゼ活性を有するポリペプチドをコードする少なくとも 1 つの遺伝子；

(i i i) グリセロール-3-ホスファターゼ活性を有するポリペプチドをコードする少なくとも 1 つの遺伝子；及び

(i v) デヒドラターゼ再活性化因子をコードする少なくとも 1 つの遺伝子

より成る 1 組の外因性遺伝子；ならびに

(b) 3-ヒドロキシプロピオナルデヒドを 1, 3-プロパンジオールに転換する非-特異的触媒活性をコードする少なくとも 1 つの内因性遺伝子を含む組換え E. コリ (E. coli) であって、組換え E. コリ 中には 1, 3-プロパンジオールオキシドレダクターゼ活性をコードする機能性 d h a T 遺伝子が存在しない組換え E. コリ。

【請求項 19】 (a) (i) グリセロール-3-リン酸デヒドロゲナーゼ活性を有するポリペプチドをコードする少なくとも 1 つの遺伝子；

(i i) グリセロール-3-ホスファターゼ活性を有するポリペプチドをコードする少なくとも 1 つの遺伝子；及び

(i i i) d h a R, o r f Y, o r f X, o r f W, d h a B 1, d h a B 2, d h a B 3 及び o r f Z の遺伝子産物をコードする少なくとも 1 つの遺伝子のサブセット

より成る 1 組の外因性遺伝子、ならびに

(b) 3-ヒドロキシプロピオナルデヒドを 1, 3-プロパンジオールに転換する非-特異的触媒活性をコードする少なくとも 1 つの内因性遺伝子を含む組換え E. コリ であって、組換え E. コリ 中には 1, 3-プロパンジオールオキシドレダクターゼ活性をコードする機能性 d h a T 遺伝子が存在しない組

換え E. コリ。

【請求項 20】 さらに、各遺伝子が遺伝子を不活性化する突然変異を有する 1 組の内因性遺伝子を含み、該組が：

- (a) グリセロールキナーゼ活性を有するポリペプチドをコードする遺伝子；
- (b) グリセロールデヒドロゲナーゼ活性を有するポリペプチドをコードする遺伝子；及び
- (c) トリオースリン酸イソメラーゼ活性を有するポリペプチドをコードする遺伝子

から成る請求項 19 の組換え E. コリ。

【請求項 21】 (a) 適した条件下で請求項 19 又は請求項 20 の組換え E. コリを単糖類、オリゴ糖類、多糖類及び 1-炭素基質より成る群から選ばれる少なくとも 1 つの炭素源と接触させ、それにより 1, 3-プロパンジオールを生産し；

(b) (a) で生産される 1, 3-プロパンジオールを場合により回収することを含む 1, 3-プロパンジオールの生物的生産のための方法。

【請求項 22】 (a) 請求項 19 又は 20 の組換え E. コリあるいはさらに：

(i) デヒドラターゼ活性を有するポリペプチドをコードする少なくとも 1 つの外因性遺伝子；

(i i) デヒドラターゼ再活性化因子をコードする少なくとも 1 つの外因性遺伝子；

(i i i) 3-ヒドロキシプロピオンアルデヒドを 1, 3-プロパンジオールに転換する非一特異的触媒活性をコードする少なくとも 1 つの内因性遺伝子を含む請求項 19 又は 20 の組換え E. コリを、グリセロール及びジヒドロキシアセトンより成る群から選ばれる少なくとも 1 つの炭素源と接触させ、

(b) (a) で生産される 1, 3-プロパンジオールを場合により回収することを含む 1, 3-プロパンジオールの生物的生産のための方法。

【請求項 23】 (a) 組換え E. コリを第 1 の炭素源及び第 2 の炭素源と接触させ、組換え E. コリは：

(i) デヒドラターゼ活性を有するポリペプチドをコードする少なくとも1つの外因性遺伝子；

(i i) デヒドラターゼ再活性化因子をコードする少なくとも1つの外因性遺伝子；

(i i i) 3-ヒドロキシプロピオナルデヒドを1, 3-プロパンジオールに転換するのに十分な非一特異的触媒活性をコードする少なくとも1つの内因性遺伝子

を含み、ここで組換えE. コリ中に1, 3-プロパンジオールオキシドレダクターゼ活性をコードする機能性d h a T遺伝子は存在せず、且つここで第1の炭素源はグリセロール及びジヒドロキシアセトンより成る群から選ばれ、第2の炭素源は单糖類、オリゴ糖類、多糖類及び1-炭素基質より成る群から選ばれ；

(b) (a)で生産される1, 3-プロパンジオールを場合により回収することを含む1, 3-プロパンジオールの生産法。

【請求項24】 組換えE. コリがさらに

(a) (i) グリセロール-3-リン酸デヒドロゲナーゼ活性を有するポリペプチドをコードする少なくとも1つの遺伝子；

(i i) グリセロール-3-ホスファターゼ活性を有するポリペプチドをコードする少なくとも1つの遺伝子；及び

(i i i) d h a R、o r f Y、o r f X、o r f W、d h a B 1、d h a B 2、d h a B 3及びo r f Zの遺伝子産物をコードする少なくとも1つの遺伝子のサブセット

より成る1組の外因性遺伝子、ならびに

(b) 各遺伝子が遺伝子を不活性化する突然変異を有し：

(i) グリセロールキナーゼ活性を有するポリペプチドをコードする遺伝子；

(i i) グリセロールデヒドロゲナーゼ活性を有するポリペプチドをコードする遺伝子；及び

(I I I) トリオースリン酸イソメラーゼ活性を有するポリペプチドをコードする遺伝子

より成る1組の内因性遺伝子

を含む請求項23の方法。

【請求項25】 配列番号：1に示す1組の遺伝子d h a R、o r f Y、d h a T、o r f X、o r f W、d h a B 1、d h a B 2、d h a B 3及びo r f Zを含むベクターp D T 2 9。

【請求項26】 配列番号：1に示すd h a R、o r f Y、o r f X、o r f W、d h a B 1、d h a B 2、d h a B 3及びo r f Zを含むベクターp K P 3 2。

【請求項27】 (a) 各遺伝子が遺伝子を不活性化する突然変異を有し：

(i) グリセロールキナーゼ活性を有するポリペプチドをコードする遺伝子；及び

(i i) グリセロールデヒドロゲナーゼ活性を有するポリペプチドをコードする遺伝子

より成る2つの内因性遺伝子の1組；

(b) グリセロール-3-リン酸デヒドロゲナーゼ活性を有するポリペプチドをコードする少なくとも1つの外因性遺伝子；

(c) グリセロール-3-ホスファターゼ活性を有するポリペプチドをコードする少なくとも1つの外因性遺伝子；ならびに

(d) プラスミドp K P 3 2

を含む組換えE. コリ株K L P 2 3。

【請求項28】 (a) 各遺伝子が遺伝子を不活性化する突然変異を有し：

(i) グリセロールキナーゼ活性を有するポリペプチドをコードする遺伝子；

(i i) グリセロールデヒドロゲナーゼ活性を有するポリペプチドをコードする遺伝子；及び

(i i i) トリオースリン酸イソメラーゼ活性を有するポリペプチドをコードする遺伝子

より成る3つの内因性遺伝子の組

を含む組換えE. コリ株R J 8。

【請求項29】 (a) 適した条件下に、dhaレギュロンを含み、且つ1, 3-プロパンジオールオキシドレダクターゼ活性をコードする機能性dhaT遺伝子が欠けている組換えE. コリを少なくとも1つの炭素源と接触させ、ここで炭素源は单糖類、オリゴ糖類、多糖類及び1-炭素基質より成る群から選ばれ；

(b) (a)で生産される1, 3-プロパンジオールを場合により回収することを含む1, 3-プロパンジオールの生産法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の分野】

本発明は、1つの微生物による発酵可能な炭素源の1, 3-プロパンジオールへの生物的転換 (biocconversion) 法を含む。

【0002】

【背景】

1, 3-プロパンジオールは、ポリエステル繊維の生産ならびにポリウレタン及び環状化合物の製造において利用性を有する可能性のあるモノマーである。

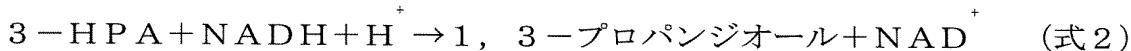
【0003】

1, 3-プロパンジオールへの多様な化学的経路が既知である。例えば触媒上でホスフィン、水、一酸化炭素、水素及び酸の存在下に、エチレンオキシドを1, 3-プロパンジオールに転換することができるか、アクリレインの接触液相水和及び続く還元によるか、あるいはグリセロールのような化合物から一酸化炭素及び水素の存在下に、周期表の第VIII族の原子を有する触媒上で反応させることができる。これらの方法により1, 3-プロパンジオールを作ることは可能であるが、それらは高価であり、且つ環境汚染物を含有する廃流を生ぜしめる。

【0004】

グリセロールの発酵から1, 3-プロパンジオールを生産できることは、1世紀を越える以前から既知であった。例えばシトロバクテル (Cytrobacter)、クロスツリジウム (Crosstridium)、エンテロバクテル (Enterobacter)、イリオバクテル (Iliobacter)、クレブシエラ (Klebsiella)、ラクトバシルス (Lactobacillus) 及びペロバクテル (Pelobacter) の群において、1, 3-プロパンジオールを生産できるバクテリア株が見いだされた。研究されたそれぞれの場合に、グリセロールは2段階の酵素触媒反応系列で1, 3-プロパンジオールに転換される。第1段階において、デヒドラターゼが3-ヒドロキシプロピオンアルデヒド (3-HPA) 及び水へのグリセロールの転換、式1を触媒する。第2段階において、3-HPAがNAD⁺一結合オキシドレダクターゼにより1, 3

—プロパンジオールに還元される、式2。1, 3—プロパンジオールはそれ以上代謝されず、結果として



媒体中に堆積する。全体的反応は1還元当量 (a reducing equivalent) を補因子、還元された β -ニコチンアミドアデニンジヌクレオシド (NADH) の形態で消費し、それはニコチンアミドアデニンジヌクレオチド (NAD⁺) に酸化される。

【0005】

クレブシエラ・ニューモニア (Klebsiella pneumonia) 、シトロバクテル・フレウンジイ (Citrobacter freundii) 及びクロストリジウム・パステウリアヌム (Clostridium pasteurianum) においては、グリセロールデヒドラターゼの3つの構造サブユニットをコードする遺伝子 (dhaB1-3又はdhaB, C及びE) が特異的1, 3—プロパンジオールオキシドレダクターゼをコードする遺伝子 (dhaT) に隣接して位置している (図1を参照されたい)。これらの微生物の間で遺伝子編成 (genetic organization) はいくらか異なるが、これらの遺伝子は、orfX及びorfZ (グリセロールデヒドラターゼのためのデヒドラターゼ再活性化因子をコードする遺伝子) ならびにorfY及びorfW (未知の機能の遺伝子) も含む1つの群に集まっている。これらの微生物の特異的1, 3—プロパンジオールオキシドレダクターゼ (dhaT's) はI I型アルコールデヒドロゲナーゼの群に属することが知られており; それぞれ保存されている鉄—結合モチーフを示し、且つ1, 3—プロパンジオール及び3—HPAのNAD⁺／NADH結合相互転換に関する優先性を有する。しかしながら、1, 3—プロパンジオール及び3—HPAのNAD⁺／NADH結合相互転換は、効率の低い速度論的パラメーターとはいえ、デヒドラターゼ酵素に特異的に結合しないアルコールデヒドロゲナーゼによっても触媒される (例えばウマ肝臓及びパン酵母アルコールデヒドロゲナーゼ (E. C. 1. 1. 1. 1))。グリセロールデヒドラターゼ (E. C. 4. 2. 1. 30) 及びジオール [1,

2-プロパンジオール] デヒドラターゼ (E. C. 4. 2. 1. 28) は関連しているが異なる酵素であり、それらは異なる遺伝子によりコードされる。クレブシエラ・オキシトカ (*Klebsiella oxytoca*) 及びサルモネラ・チフィムリウム (*Salmonella typhimurium*) からのジオールデヒドラターゼ遺伝子はグリセロールデヒドラターゼ遺伝子に似ており、*orfX* 及び *orfZ* に類似の遺伝子を含む1つの群に集まっている (Dani et al., FEMS Microbiol. Rev. 22, 553 (1999); Toraya and Mori, J. Biol. Chem. 274, 3372 (1999); GenBank AF026270)。

【0006】

グリセロールからの1, 3-プロパンジオールの生産は一般に嫌気性条件下でグリセロールを単独の炭素源として用いて、且つ他の外因性還元当量受容物質の不在下で行われる。これらの条件下で、例えばシトロバクテル、クロスツリジウム及びクレブシエラの株においては、最初に NAD^+ (もしくは NADP^+) 結合グリセロールデヒドロゲナーゼによるグリセロールのジヒドロキシアセトン (DHA) への酸化、式3を含むグリセロールに関する平行経路が働く。DHAは、DHAキナーゼによるジヒドロキシアセトンリン酸 (DHAP) へのリン酸化 (式4) に続き、



生合成及び例えば解糖を介するATP生成の支持のために利用可能になる。1, 3-プロパンジオール経路と対照的に、この経路は細胞に炭素及びエネルギーを与えることができ、NADHを消費するのではなく生産する。

【0007】

クレブシエラ・ニューモニアエ (*Klebsiella pneumoniae*) 及びシトロバクテル・フレウンジイの場合、グリセロールデヒドラターゼ (dh a B)、1, 3-プロパンジオールオキシドレダクターゼ (dh a T)、グリセロールデヒドロゲナーゼ (dh a D) 及びジヒドロキシアセトンキナーゼ (dh a K) の機能的に結合した活性をコードする遺伝子は dh a レギュロンによ

り包含されている。d h a レギュロンは、クレブシェラ・ニューモニアエ及びシトロバクテル・フレウンジイの場合、転写アクチベータタンパク質をコードする遺伝子 (d h a R) も包含している。シトロバクテル及びクレブシェラからの d h a レギュロンはエシェリキア・コリ (*Escherichia coli*) において発現され、グルセロールを 1, 3-プロパンジオールに転換することが示された。

【0008】

1, 3-プロパンジオールの生産のための上記で記載した化学的方法も生物的方法も、工業的規模の生産には十分に適しておらず、それは化学的方法はエネルギー集約的であり、生物的方法は高価な出発材料であるグリセロールからの比較的低い力価に限られるからである。これらの欠点は、低いエネルギー投入及び炭水化物又は糖類のような安価な出発材料を必要とする方法を用いて、あるいはグリセロール法の代謝効率を向上させることにより、克服され得た。いずれの方法の開発も、グリセロールへの糖類の、及び 1, 3-プロパンジオールへのグリセロールの転換を担う遺伝子機構 (*genetic machinery*) を操作する能力を必要とするであろう。

【0009】

グリセロールの生産のための生物的方法は既知である。圧倒的大多数のグリセロール生産物質は酵母であるが、いくつかのバクテリア、他の菌・カビ及び藻類も既知である。バクテリア及び酵母の両方はグルコース又は他の炭水化物を解糖又は Embden Meyerhof Parnas 経路におけるフルクトース-1, 6-二リン酸経路を介して転換することによってグリセロールを生産するが、ある種の藻類は葉緑体中に溶解した二酸化炭素又は重炭酸塩をカルビンサイクルの 3-炭素中間体に転換する。1 系列の段階において、3-炭素中間体であるホスホグリセリン酸はグリセルアルデヒド 3-リン酸に転換され、それはそのケト異性体であるジヒドロキシアセトンリン酸、そして究極的にはグリセロールに容易に相互転換され得る。

【0010】

特定的にはバクテリア、バシルス・リチエニホルミス (*Bacillus* 1

icheniformis) 及びラクトバシルス・リコペルシカ (Lactobacillus lycopersica) がグリセロールを合成し、耐塩性藻類ドウナリエラ種 (*Dunaliella* sp.) 及びアステロモナス・グラシリス (*Asteromonas gracilis*) において、高い外部塩濃度に対する保護のためにグリセロール生産が見いだされる。同様に、種々の耐浸透圧性 (osmotolerant) 酵母が保護手段としてグリセロールを合成する。サッカロミセスのほとんどの株はアルコール発酵の間にいくらかのグリセロールを生産し、浸透圧ストレスの適用によりこれを生理学的に増加させることができる。本世紀初期に、亜硫酸塩もしくはアルカリのような「ステアリング試薬 (steering reagents)」が加えられたサッカロミセス培養の使用により商業的グリセロール生産が達成された。不活性な錯体の生成を介して、ステアリング試薬はエタノールへのアセトアルデヒドの転換を遮断もしくは阻害し；かくして過剰の還元当量 (NADH) がグリセロールを生産するための還元に利用され得るか、又はそのためにD H A Pに向かって「ステアリングされる」。この方法は亜硫酸塩の故である酵母成長の部分的阻害により制限される。種々の機構により過剰のNADH当量を生ぜしめるアルカリの使用により、この制限を部分的に克服することができる。この実施の場合、アルカリはカニッツアロ不均化を開始させて2当量のアセトアルデヒドからエタノールと酢酸を与える。

【0011】

グリセロール-3-リン酸デヒドロゲナーゼをコードする遺伝子 (DAR1, GDP1) が *S. diastaticus* (*S. diastaticus*) からクローニングされ、配列決定された (Wang et al., J. Bact. 176, 7091-7095 (1994))。DAR1遺伝子はシャトルベクター中にクローニングされ、E. コリを形質転換するために用いられ、そこで発現は活性な酵素を生産した。Wang et al. (同上) はDAR1が細胞の浸透圧環境 (osmotic environment) により調節されることを認識したが、組換え微生物における1, 3-プロパンジオール生産を増強するためにどのように遺伝子を用い得るかを示唆してはいない。

【0012】

他のグリセロール-3-リン酸デヒドロゲナーゼ酵素が単離された：例えば *s* *n*-グリセロール-3-リン酸デヒドロゲナーゼがサッカロミセス・セレビシアエ (*Saccharomyces cerevisiae*) からクローニングされ、且つ配列決定され (*Larason et al.*, *Mol. Microbiol.* 10, 1101 (1993))、*Albertyn et al.* (*Mol. Cell. Biol.* 14, 4135 (1994)) はサッカロミセス・セレビシアエからのグリセロール-3-リン酸デヒドロゲナーゼをコードする GPD1 のクローニングを記載している。*Wang et al.* (同上) と同様に、*Albertyn et al.* 及び *Larason et al.* の両方はこの遺伝子の調節の浸透圧-感受性を認識しているが、組換え微生物中での 1, 3-プロパンジオールの生産においてどのように遺伝子を用い得るかを示唆してはいない。

【0013】

G3PDH の場合と同様に、グリセロール-3-ホスファターゼがサッカロミセス・セレビシアエから単離され、該タンパク質が GPP1 及び GPP2 遺伝子によりコードされることが同定された (*Norbeck et al.*, *J. Biol. Chem.* 271, 13875 (1996))。G3PDH をコードする遺伝子と同様に、GPP2 は浸透圧感受性 (*osmosensitive*) であると思われる。

【0014】

グリセロール又はジヒドロキシアセトン以外の発酵可能な炭素源の 1, 3-プロパンジオールへの 1 微生物転換 (*single microorganism conversion*) は望ましいが、そのような試みには克服されるべきかなりの困難があることが実証されている。例えば *Gottschalk et al.* (EP 373 230) は、シトロバクテル・フレウンジイ、クロスツリジウム・アウトブチリクム (*Clostridium autobutylicum*)、クロスツリジウム・ブチリクム (*Clostridium butylicum*) 及びクレブシェラ・ニューモニアエを含む 1, 3-プロパンジオール

の生産に有用なほとんどの株の成長がフルクトース又はグルコースのような水素供与体の存在により攪乱されると記載している。グリセロールとフルクトース又はグルコースの共一発酵において1, 3-プロパンジオールを生産するラクトバシルス・ブレビス (*Lactobacillus brevis*) 及びラクトバシルス・ブクネル (*Lactobacillus buchneri*) の株は、グリセロールが唯一の炭素源として与えられると成長せず、休止細胞はグルコース又はフルクトースを代謝できることが示されているが、それらは1, 3-プロパンジオールを生産しない (Veiga DA Cunha et al., J. Bacteriol., 174, 1013 (1992))。同様に、グリセロール及びアセテートが与えられると1, 3-プロパンジオールを生産するイリオバクテル・ポリトロpus (*Ilyobacter polytropus*) の株は、フルクトース及びグルコースを含むグリセロール以外の炭素基質から1, 3-プロパンジオールを生産しないであろうことが示されている (Steib et al., Arch. Microbiol. 140, 139 (1984))。最後に、Tong et al. (Appl. Biochem. Biotech. 34, 149 (1992)) は、グルセロールデヒドラターゼをコードするdh_a レギュロンを用いて形質転換された組換えエシェリキア・コリが外因性グルセロールの不在下でグルコース又はキシロースから1, 3-プロパンジオールを生産しないことを記載した。

【0015】

グリセロールからの1, 3-プロパンジオールの収率を向上させる試みが報告されており、その試みでは還元当量を与えることができる共一基質、典型的には発酵可能な糖類がプロセス中に含まれる。グリセロール及びグルコースを共一発酵させるシトロバクテル・フレウンジイ及びクレブシェラ・ニューモニアエ D SM 4270の休止細胞に関する収率における向上が特許請求されている (Gottschalk et al., 同上; ならびにTran-Dinh et al., DE 3734764); しかしグリセロール及びグルコースを共一発酵させるクレブシェラ・ニューモニアエ ATCC 25955の成長細胞に関しては特許請求されておらず、それは1, 3-プロパンジオールを生産しな

かつた (I-T. Tong, Ph. D. Thesis, University of Wisconsin-Madison (1992))。組換えエシエリキア・コリによるグルセロールとグルコース又はフルクトースの共発酵に関する収率の向上が報告されている; しかしながらグリセロールの不在下で 1, 3-プロパンジオールは生産されない (Tong et al., 同上)。これらの系においては、1 つの微生物が細胞保持又は成長のためのエネルギー及び炭素を与えながら NADH 生成の源として炭水化物を用いている。これらの開示は、糖類が 1, 3-プロパンジオールを生産する炭素の流れに入らないことを示唆している。

【0016】

しかしながら最近、デヒドラターゼ酵素を発現する 1 つの微生物によるグリセロール又はジヒドロキシアセトン以外の炭素基質の 1, 3-プロパンジオールへの転換が記載された (U. S. 5, 686, 276; WO 9821339; WO 9928480; 及び WO 9821341 (US 6013494))。グリセロール又はグルコースのいずれかからの 1, 3-プロパンジオールの生産に導く生物的プロセスにおける特別な欠点は、発酵を介して達成される生産物の低い力価であった; かくして水性発酵ブイヨンから 1, 3-プロパンジオールを得るためのエネルギー集約的な分離プロセスが必要である。1, 3-プロパンジオールへのグリセロールのフェドバッチ (feed batch) 又はバッチ発酵はクロスツリジウム・ブチリクムにより 65 g/L (Saint-Amans et al., Biotechnology Letters 16, 831 (1994))、クロスツリジウム・ブチリクム突然変異株により 71 g/L (Abbad-Andalousi et al., Appl. Environ. Microbiol. 61, 4413 (1995))、クレブシエラ・ニューモニアエにより 61 g/L (Homann et al., Appl. Biobiol. Biotechnol. 33, 121 (1990)) 及びシトロバクテル・フレウンジイにより 35 g/L (Homann et al., 同上) の最終的力価に導いた。グリセロール発酵から得られる力価を越えるグルコースの 1, 3-プロパンジオールへの発酵はまだ開示されたことがない。

【0017】

解決されるべく残っている問題は、グルコース又は他の糖類のような安価な炭素基質から高い力価で、且つ1つの微生物によって1, 3-プロパンジオールを生物的に生産するやり方である。1, 3-プロパンジオールの生物的生産は2一段階連続反応のための基質としてグリセロールを必要とし、その反応ではデヒドラターゼ酵素（典型的には補酵素B₁₂－依存性デヒドラターゼ）がグリセロールを中間体である3-ヒドロキシプロピオナルデヒドに転換し、それが次いでNADH-（もしくはNADPH）依存性オキシドレダクターゼにより1, 3-プロパンジオールに還元される。補因子が必要であることの複雑さは、1, 3-プロパンジオールの生産のためにこの反応系列を使用する工業的プロセスのために全細胞触媒の使用を必要とする。

【0018】

【発明の概略】

出願人等は上記の問題を解決し、本発明は以前に得られたより有意に高い力価における、且つ1つの微生物の使用での発酵可能な炭素源の1, 3-プロパンジオールへの直接の生物的転換を提供する。モデル基質としてグルコースを用い、モデル宿主としてE. コリ (E. coli) を用いる。本発明の1つの側面において、1群の遺伝子（デヒドラターゼ活性、デヒドラターゼ再活性化因子、1, 3-プロパンジオールオキシドレダクターゼ (dhxT) 、グリセロール-3-リン酸デヒドロゲナーゼ及びグリセロール-3-ホスファターゼをコードする遺伝子を含む）を発現する組換えE. コリがグリセロールから1, 3-プロパンジオールへの発酵の力価に近い力価でグルコースを1, 3-プロパンジオールに転換する。

【0019】

本発明の他の側面において、この組換えE. コリ中の機能性dhxT遺伝子の除去が、グルコースからの1, 3-プロパンジオールの有意により高い力価を生ずる。この予測されなかった力価における増加は経済性の向上及びかくしてグルコースからの1, 3-プロパンジオールの生産のための改良法を生ずる。

【0020】

さらに本発明は、1) グリセロール、2) ジヒドロキシアセトン、3) グリセロールの酸化状態におけるC₃化合物（例えばグリセロール3-リン酸）あるいは4) ジヒドロキシアセトンの酸化状態におけるC₃化合物（例えばジヒドロキシアセトンリン酸又はグリセルアルデヒド3-リン酸）に容易に転換されるいずれの炭素基質をも含むように一般的に応用され得る。d h a Tマイナス株における1, 3-プロパンジオールの生産は、3-HPAを1, 3-プロパンジオールに転換する非一特異的触媒活性を必要とする。3-HPAを1, 3-プロパンジオールに転換する非一特異的触媒活性を担う単数もしくは複数の酵素及び／又は単数もしくは複数の遺伝子の同定は、広範囲の炭素一含有基質からの基質を用いる広範囲の宿主微生物における1, 3-プロパンジオールの生産に導くであろう。3-HPAを1, 3-プロパンジオールに転換するこの非一特異的触媒活性の使用が、増加する力値及び得られる向上した経済性のおかげで、グリセロール又はジヒドロキシアセトンからの1, 3-プロパンジオールの生産のための改良法に導くであろうことも予測される。

【0021】

この活性は、配列番号：58に示される、あるいは：

- (a) 配列番号：57のアミノ酸配列のすべて又は実質的部分をコードする単離された核酸フラグメント；
- (b) 配列番号：57のアミノ酸配列のすべて又は実質的部分をコードする単離された核酸フラグメントに実質的に類似している単離された核酸フラグメント；
- (c) 配列番号：57のアミノ酸配列の少なくとも80% (at least 80% with) を有する少なくとも387個のアミノ酸のポリペプチドをコードする単離された核酸フラグメント；
- (d) 0.1XSSC、0.1%SDS、65°Cのハイブリダイジェーション条件下で(a)とハイブリダイジェーションし、2XSSC、0.1%SDS、及び繰り返して0.1XSSC、0.1%SDSを用いて洗浄された単離された核酸フラグメント；ならびに
 - (d) (a)、(b)、(c) 又は (d) に相補的である単離された核酸フラ

グ

メント

より成る群から選ばれる、3-ヒドロキシプロピオンアルデヒドの1, 3-プロパンジオールへの転換のための非一特異的触媒活性をコードする核酸フラグメントとしてE. コリから単離された。あるいはまた、非特異的触媒活性は配列番号: 57に示されるポリペプチドにおいて具体化される。

【0022】

適した調節配列に操作可能に結合された上記の単離された核酸フラグメントを含むキメラ遺伝子を構築することができる。このキメラ遺伝子を用いてシトロバクテル、エンテロバクテル (*Enterobacter*)、クロスツリジウム、クレブシエラ、アエロバクテル (*Aerobacter*)、ラクトバシルス、アスペルギルス (*Aspergillus*)、サッカロミセス、シゾサッカロミセス (*Schizosaccharomyces*)、チゴサッカロミセス (*Zygosaccharomyces*)、ピチア (*Pichia*)、クルイベロミセス (*Kluyveromyces*)、カンジダ (*Candida*)、ハンセンユラ (*Hansenula*)、デバリオミセス (*Debaryomyces*)、ムコル (*Mucor*)、トルロプシス (*Torulopsis*)、メチロバクテル (*Methylbacter*)、サルモネラ (*Salmonella*)、バシルス (*Bacillus*)、アエロバクテル (*Aerobacter*)、ストレプトミセス (*Streptomyces*)、エシェリキア及びシュードモナス (*Escherichia*及 *Pseudomonas*) より成る群から選ばれる微生物を形質転換することができる。E. コリが好ましい宿主である。

【0023】

従って本発明は: (a) グリセロール-3-リン酸デヒドロゲナーゼ活性を有するポリペプチドをコードする少なくとも1つの遺伝子; (b) グリセロール-3-ホスファターゼ活性を有するポリペプチドをコードする少なくとも1つの遺伝子; (c) デヒドラターゼ活性を有するポリペプチドをコードする少なくとも1つの遺伝子; (d) デヒドラターゼ再活性化因子をコードする少なくとも1つの遺伝子; (e) 3-ヒドロキシプロピオンアルデヒドを1, 3-プロパンジオ

ールに転換するのに十分な非一特異的触媒活性をコードする少なくとも1つの内因性遺伝子を含み、1, 3-プロパンジオールオキシドレダクターゼをコードする機能性d h a T遺伝子が存在しない1, 3-プロパンジオールの生産に有用な組換え微生物を提供する。好ましい態様は、d h a T遺伝子が存在しない組換え微生物（好ましくはE. コリ）である。場合により組換え微生物は：（a）グリセロールキナーゼ活性を有するポリペプチドをコードする遺伝子；（b）グリセロールデヒドロゲナーゼ活性を有するポリペプチドをコードする遺伝子；（c）トリオースリン酸イソメラーゼ活性を有するポリペプチドをコードする遺伝子より成る群から選ばれる内因性遺伝子において突然変異（例えば欠失突然変異又は点突然変異）を含んでいることができる。

又 他の態様において、本発明は：（a）適した条件下で、d h a レギュロンを含み且つ1, 3-プロパンジオールオキシドレダクターゼ活性をコードする機能性d h a T遺伝子が欠けている組換えE. コリを単糖類、オリゴ糖類、多糖類及び1-炭素基質より成る群から選ばれる少なくとも1つの炭素源と接触させ；（b）（a）で生産される1, 3-プロパンジオールを場合により回収することを含む1, 3-プロパンジオールの生産のための方法を含む。

【0024】

本発明は：（a）本発明の組換え微生物を単糖類、オリゴ糖類、多糖類及び1-炭素基質より成る群から選ばれる少なくとも1つの炭素源と接触させ、それにより1, 3-プロパンジオールを生産し；（b）（a）で生産される1, 3-プロパンジオールを場合により回収することを含む、組換え微生物からの1, 3-プロパンジオールの生産のための方法も提供する。

【0025】

同様に、本発明は：

- （a）（i）デヒドラターゼ活性を有するポリペプチドをコードする少なくとも1つの遺伝子；
- （i i）デヒドラターゼ再活性化因子をコードする少なくとも1つの遺伝子；
- （i i i）3-ヒドロキシプロピオンアルデヒドを1, 3-プロパンジ

オールに転換するのに十分な非一特異的触媒活性をコードする少なくとも1つの内因性遺伝子

を含み；1，3-プロパンジオールオキシドレダクターゼをコードする機能性d h a T遺伝子が存在しない組換え微生物を、グリセロール及びジヒドロキシアセトンより成る群から選ばれる少なくとも1つの炭素源と接触させ、そこにおいて1，3-プロパンジオールを生産し；

(b) (a)で生産される1，3-プロパンジオールを場合により回収することを含む、組換え微生物からの1，3-プロパンジオールの生産のための方法を提供することを目的とする。

【0026】

本発明のさらに別の側面は炭素基質の共一供給を提供する。1，3-プロパンジオールの生産のためのこの態様において、段階は：(a)組換えE.コリを第1の炭素源及び第2の炭素源と接触させ、該組換えE.コリは：(i)デヒドラターゼ活性を有するポリペプチドをコードする少なくとも1つの外因性遺伝子；(i i)デヒドラターゼ再活性化因子をコードする少なくとも1つの外因性遺伝子；(i i i)3-ヒドロキシプロピオンアルデヒドを1，3-プロパンジオールに転換するのに十分な非一特異的触媒活性をコードする少なくとも1つの外因性遺伝子を含み、ここで組換えE.コリ中に1，3-プロパンジオールオキシドレダクターゼ活性をコードする機能性d h a T遺伝子は存在せず、且つここで該第1の炭素源はグリセロール及びジヒドロキシアセトンより成る群から選ばれ、該第2の炭素源は单糖類、オリゴ糖類、多糖類及び1-炭素基質より成る群から選ばれ；(b) (a)で生産される1，3-プロパンジオールを場合により回収する段階である。共一供給は連続的又は同時であることができる。共一供給の態様において用いられる組換えE.コリはさらに：(a) (i)グリセロール-3-リン酸デヒドロゲナーゼ活性を有するポリペプチドをコードする少なくとも1つの遺伝子；(i i)グリセロール-3-ホスファターゼ活性を有するポリペプチドをコードする少なくとも1つの遺伝子；及び(i i i) d h a R、o r f Y、o r f X、o r f W、d h a B 1、d h a B 2、d h a B 3及びo r f Zの遺伝子産物をコードする遺伝子の少なくとも1つのサブセットより成る1組の外因

性遺伝子、ならびに (b) 各遺伝子が遺伝子を不活性化する突然変異を有し： (i) グリセロールキナーゼ活性を有するポリペプチドをコードする遺伝子； (ii) グリセロールデヒドロゲナーゼ活性を有するポリペプチドをコードする遺伝子；及び (III) トリオースリン酸イソメラーゼ活性を有するポリペプチドをコードする遺伝子より成る 1 組の内因性遺伝子を含むことができる。

【0027】

有用な組換え E. コリ株には、(a) 各遺伝子が遺伝子を不活性化する突然変異を有し： (i) グリセロールキナーゼ活性を有するポリペプチドをコードする遺伝子；及び (ii) グリセロールデヒドロゲナーゼ活性を有するポリペプチドをコードする遺伝子より成る 2 つの内因性遺伝子の 1 組； (b) グリセロール-3-リン酸デヒドロゲナーゼ活性を有するポリペプチドをコードする少なくとも 1 つの外因性遺伝子； (c) グリセロール-3-ホスファターゼ活性を有するポリペプチドをコードする少なくとも 1 つの外因性遺伝子；ならびに (d) プラスマミド pKP32 を含む組換え E. コリ株 KLP23 ならびに (a) 各遺伝子が遺伝子を不活性化する突然変異を有し： (i) グリセロールキナーゼ活性を有するポリペプチドをコードする遺伝子； (ii) グリセロールデヒドロゲナーゼ活性を有するポリペプチドをコードする遺伝子；及び (iii) トリオースリン酸イソメラーゼ活性を有するポリペプチドをコードする遺伝子より成る 3 つの内因性遺伝子の組を含む組換え E. コリ株 R J 8 が含まれる。

【0028】

他の有用な態様には： (a) (i) デヒドラターゼ活性を有するポリペプチドをコードする少なくとも 1 つの遺伝子； (ii) グリセロール-3-リン酸デヒドロゲナーゼ活性を有するポリペプチドをコードする少なくとも 1 つの遺伝子； (iii) グリセロール-3-ホスファターゼ活性を有するポリペプチドをコードする少なくとも 1 つの遺伝子；及び (iv) デヒドラターゼ再活性化因子をコードする少なくとも 1 つの遺伝子より成る 1 組の外因性遺伝子；ならびに (b) 3-ヒドロキシプロピオナルデヒドを 1, 3-プロパンジオールに転換する非特異的触媒活性をコードする少なくとも 1 つの内因性遺伝子を含む組換え E. コリが含まれ、ここで組換え E. コリ中には 1, 3-プロパンジオールオキシド

レダクターゼ活性をコードする機能性 d h a T 遺伝子が存在しない。

【0029】

別の態様は： (a) (i) グリセロール-3-リン酸デヒドロゲナーゼ活性を有するポリペプチドをコードする少なくとも1つの遺伝子； (ii) グリセロール-3-ホスファターゼ活性を有するポリペプチドをコードする少なくとも1つの遺伝子； 及び (iii) d h a R、o r f Y、o r f X、o r f W、d h a B 1、d h a B 2、d h a B 3 及び o r f Z の遺伝子産物をコードする遺伝子の少なくとも1つのサブセットより成る1組の外因性遺伝子、ならびに (b) 3-ヒドロキシプロピオンアルデヒドを1, 3-プロパンジオールに転換する非一特異的触媒活性をコードする少なくとも1つの内因性遺伝子を含む組換えE. コリであり、ここで組換えE. コリ中には1, 3-プロパンジオールオキシドレダクターゼ活性をコードする機能性 d h a T 遺伝子が存在しない。この態様は、それぞれの遺伝子が遺伝子を不活性化する突然変異を有する1組の内因性遺伝子をさらに含む組換えE. コリを用いる方法も包含し、該組は： (a) グリセロールキナーゼ活性を有するポリペプチドをコードする遺伝子； (b) グリセロールデヒドロゲナーゼ活性を有するポリペプチドをコードする遺伝子； 及び (c) トリオースリン酸イソメラーゼ活性を有するポリペプチドをコードする遺伝子から成る。

【0030】

この態様はさらに、(a) 適した条件下で、開示したばかりの (immendedly disclosed) 組換えE. コリを単糖類、オリゴ糖類、多糖類及び1-炭素基質より成る群から選ばれる少なくとも1つの炭素源と接触させ、それにより1, 3-プロパンジオールを生産し； (b) (a) で生産される1, 3-プロパンジオールを場合により回収することを含む1, 3-プロパンジオールの生物的生産のための方法を含む。

【0031】

ならびに又、(a) さらに： (i) デヒドラターゼ活性を有するポリペプチドをコードする少なくとも1つの外因性遺伝子； (ii) デヒドラターゼ再活性化因子をコードする少なくとも1つの外因性遺伝子； (iii) 3-ヒドロキシプロピオンアルデヒドを1, 3-プロパンジオールに転換する非一特異的触媒活性

をコードする少なくとも1つの内因性遺伝子を含む開示したばかりの態様の組換えE. コリをグリセロール及びジヒドロキシアセトンより成る群から選ばれる少なくとも1つの炭素源と接触させ、(b) (a) で生産される1, 3-プロパンジオールを場合により回収することを含む1, 3-プロパンジオールの生物的生産のためのさらに別の方も包含する。

【0032】

【図面、配列の記載及び生物の寄託の簡単な記述】

本出願の各部を成す下記の詳細な記述、図、付随する配列の記載及び生物の寄託から、本発明をさらに十分に理解することができる。

【0033】

図1はd h a レギュロンサブクローンp HK 28-26の配列内の遺伝子編成を表す。

【0034】

図2は本質的に実施例7に記載するビタミンB₁₂の一定の供給を用いた2つの発酵実験の間で比較される細胞外可溶性タンパク質(g/L)のグラフを表す。実線の1つの場合、用いられた株はKLP23/pAH48/pKP32であった。破線の他の場合、用いられた株はKLP23/pAH48/pDT29であった。

【0035】

図3は本質的に実施例7に記載するビタミンB₁₂の一定の供給を用いた2つの発酵実験の間で比較される細胞生存率[(生存細胞/mL)/OD550]のグラフを表す。1つの場合(実線)、用いられた株はKLP23/pAH48/pKP32であった。他の場合(破線)、用いられた株はKLP23/pAH48/pDT29であった。

【0036】

図4は本質的に実施例7に記載する、しかしビタミンB₁₂又は補酵素B₁₂の不在下における2つの発酵実験の間で比較されるグルコースからのグリセロールの収率のグラフを表す。1つの場合(実線)、用いられた株はKLP23/pAH48/pKP32であった。他の場合(破線)、用いられた株はKLP23/p

AH48/pDT29であった。

【0037】

図5は1, 3-プロパンジオールへのグルコースの代謝的転換を示す流れ図である。

【0038】

図6は未変性ゲル (native gel) 上の内因性E. コリオキシドレダクターゼ活性 (非-特異的触媒活性) を示すバンドから抽出される可溶性タンパク質画分を用いた2D-PAGE膜プロットである。

【0039】

68の配列の記載及び本明細書に添付する配列表は、37 C. F. R. § 1 . 821-1. 825 (“Requirements for Patent Applications Containing Nucleotide Sequences and/or Amino Acid Sequence Disclosures—the Sequence Rules”) に示されている特許出願におけるヌクレオチド及び／又はアミノ酸配列開示を管理している規則に従い、World Intellectual Property Organization (WIPO) Standard ST2. 5 (1988) ならびにEPO及びPCTの配列表条件 (Administration Instructions of Rules 5. 2及び49. 5 (a-bis) 及びSection 208及びAnnex C) と一致するであろう。配列の記載は、引用することによりその記載事項が本明細書の内容となるNucleic Acids Res. 13, 3021-3030 (1985) 及びBiological Journal 209, 345-373 (1984) に記載されているIUPAC-IYUB標準に準拠して定義されるヌクレオチド配列記号に関する1文字コード及びアミノ酸に関する3文字コードを含有する。

【0040】

配列番号：1はpIBI31 (IBI Biosystem, New Haven, CT) 中にサブクローニングされ、pHK28-26と命名されたpKPI (クレブシェラ・ニューモニアエからのDNAを含有するコスミド) からの1

2. 1 kbのEcoRI-SalIフラグメントから決定されるヌクレオチド配列を含有する。表1がさらに配列番号：1内で同定される遺伝子、対応する塩基対及び関連する機能を詳細に示している。実施例1も参照されたい。

【0041】

配列番号：57はyqhDに関して決定されるヌクレオチド配列を含有する。

【0042】

出願人等はBudapest Treaty on the International Recognition of the Deposit of Microorganisms for the Purposes of Patent Procedureの協約の下に以下の生物の寄託を行った：

配列番号：58はYahDに関して決定されるアミノ酸配列を含有する。

寄託者確認	国際寄託所	
参照 (reference)	名	寄託の日付
グリセロールデヒドラターゼ酵素をコードするクレブシエラゲノムの1部を含有する形質転換E. コリDH5 α	ATCC 69789	1995年4月18日
ジオールデヒドラターゼ酵素をコードするクレブシエラゲノムの1部を含有するコスミドpKP4を含有する形質転換E. コリDH5 α	ATCC 69790	1995年4月18日
E. コリMSP33.6	ATCC 98598	1997年11月25日
g1pK突然変異株	ATCC 98597	1997年11月25日
E. コリRJF10m		

寄託物は示した国際寄託所に少なくとも30年間保持され、それを開示している特許が認可されると公共に利用可能とされるであろう。寄託物の利用可能性は、政府の指令により認可される特許権の減損において本発明を実施する許諾を構成しない。

【0043】

本明細書で用いられる「ATCC」とは、10801 University

B l v d. , Manassas , VA 20110-2209 U. S. A.

にあるAmerican Type Culture Collection国際寄託所を指す。「ATCC番号」は、ATCCに寄託した際の培養物への受け入れ番号である。

【0044】

【発明の詳細な記述】

本発明は発酵可能な炭素源を直接1, 3-プロパンジオールに、1つの微生物を用いて生物的に転換するための改良法を提供する。該方法は増加した力価、収率及び細胞生存率ならびに発酵の間の細胞ライシスの減少を特徴とする。

【0045】

本発明は、1, 3-プロパンジオールオキシドレダクターゼ (d h a T) を含む1, 3-プロパンジオール発酵プロセスが培地中における高いレベルの3 H P A及び他のアルデヒド及びケトンを特徴とし、それが細胞生存率の減少と関連しているという観察に部分的に基づいている。本発明は、モデル宿主であるE. コリが、3-ヒドロキシプロピオンアルデヒドを1, 3-プロパンジオールに転換できる内因性非一特異的触媒活性により、3-H P Aを1, 3-プロパンジオールに転換できるという予期せぬ発見にも部分的に基づいている。本発明はさらに、この非一特異的触媒活性を含み且つ機能性d h a Tが欠けているE. コリ発酵プロセスが発酵の間に細胞生存率の向上を生じ、機能性d h a Tを含む発酵プロセスより高い1, 3-プロパンジオールの力価及び／又は収率を与えるという予期せぬ発見に部分的に基づいている。

【0046】

1つの側面においては、グリセロールがモデル基質であり、宿主微生物は1, 3-プロパンジオールオキシドレダクターゼ活性がないように野生一型d h a Tにおける突然変異を有しており、且つ3-ヒドロキシプロピオンアルデヒドを1, 3-プロパンジオールに転換するのに十分な非一特異的触媒活性を含んでいる。他の側面においては、グルコースがモデル基質であり、組換えE. コリがモデル宿主である。この側面の場合、E. コリは3-ヒドロキシプロピオンアルデヒドを1, 3-プロパンジオールに転換するのに十分な内因性非一特異的触媒活性

を含んでいる。1つの態様の場合、非一特異的触媒活性はアルコールデヒドロゲナーゼである。

【0047】

1つの側面において、本発明は（a）グリセロール-3-リン酸デヒドロゲナーゼ活性を有するポリペプチドをコードする少なくとも1つの遺伝子；（b）グリセロール-3-ホスファターゼ活性を有するポリペプチドをコードする少なくとも1つの遺伝子；（c）デヒドラターゼ活性を有するポリペプチドをコードする少なくとも1つの遺伝子；（d）デヒドラターゼ再活性化因子をコードする少なくとも1つの遺伝子；及び（e）3-ヒドロキシプロピオナルデヒドを1,3-プロパンジオールに転換するのに十分な非一特異的触媒活性をコードする少なくとも1つの内因性遺伝子を含む1群の遺伝子を発現する組換えE.コリを提供し；この微生物の使用は高い力価でグルコースを1,3-プロパンジオールに転換する。本発明の他の側面において、この組換えE.コリ中の機能性dhaT遺伝子の除去は、以前に得られたより予期せぬ程高いグルコースからの1,3-プロパンジオールの力価を与える。

【0048】

本発明は、1つの微生物における発酵可能な炭素源からの1,3-プロパンジオールの生物的生産のための改良法を提供する。本発明の1つの側面において、1,3-プロパンジオールへのグルコースの転換のための改良法は、クレブシエラ・ニューモニアエdhaレギュロン遺伝子dhaR、orfY、dhaT、orfX、orfW、dhab1、dhab2、dhab3及びorfZを用いて形質転換された宿主E.コリを含む組換え微生物の使用により達成され、これらの遺伝子のすべては野生型クレブシエラ・ニューモニアエ中に存在すると同じ遺伝子体制で配置される。発酵プロセスに関して得られる力価は、類似の発酵に関して以前に報告されたいずれの力価よりも有意に高い。この向上は実施例6及び実施例7で記載するプラスミドpDT29の使用に頼っている。

【0049】

本発明の他の側面において、G3PDH、G3Pホスファターゼ、デヒドラターゼ、デヒドラターゼ再活性化因子及び又機能性dhaTをコードする遺伝子を

含有する組換えE. コリを用いる方法と比較して、グルコースからの1, 3-プロパンジオールの生産のためのさらに改良された方法が、G 3 P D H、G 3 Pホスファターゼ、デヒドラターゼ及びデヒドラターゼ再活性化因子をコードする遺伝子を含有する組換えE. コリを用いて達成される。劇的に改良された方法は、E. コリ中に存在する、アルコールデヒドロゲナーゼであると予測される非一特異的触媒活性をコードする内因性遺伝子に頼っている。

【0050】

該方法における劇的な向上は、実施例7及び9に示す1, 3-プロパンジオール力価の向上として明らかである。該方法における向上は、発酵ブイヨン中の細胞外可溶性タンパク質濃度により決定される細胞ライシスの減少としても明らかである。本発明のこの側面を図2に示す。さらに該方法における向上は、発酵の経過に及ぶ長期間の細胞生存率 (p r o l o n g e d c e l l v i a b i l i t y) として明らかである。本発明のこの側面を図3に示す。さらに本発明における向上は収率の向上としても明らかである。1, 3-プロパンジオールオキシドレダクターゼ (d h a T) を発現するE. コリ (例えばプラスミドp D T 2 9を用いて形質転換されたE. コリK L P 2 3)においては、グリセロールは3-H P A以外の産物に代謝され得る。まさに対照的に、1, 3-プロパンジオールオキシドレダクターゼ (d h a T) を発現しないE. コリ (例えばプラスミドp K P 3 2を用いて形質転換されたE. コリK L P 2 3)においては、グリセロールは3-H P A以外の産物に代謝されない。この謎の経路が機能性d h a Tの存在もしくは不在に帰せられ得ることは、図4に示すようなグルコースからのグリセロールのより低い収率により示される。

【0051】

本明細書で用いられる場合、特許請求の範囲及び明細書の説明のために以下の用語が用いられ得る。

【0052】

「グリセロール-3-リン酸デヒドロゲナーゼ」及び「G 3 P D H」は、ジヒドロキシアセトンリン酸 (D H A P) のグリセロール-3-リン酸 (G 3 P) への転換を触媒する酵素活性を担うポリペプチドを指す。生体内でG 3 P D HはN

ADH; NADPH; 又はFAD-依存性であることができる。補因子特異的グリセロール-3-リン酸デヒドロゲナーゼを特定的に指す場合、「NADH-依存性グリセロール-3-リン酸デヒドロゲナーゼ」、「NADPH-依存性グリセロール-3-リン酸デヒドロゲナーゼ」及び「FAD-依存性グリセロール-3-リン酸デヒドロゲナーゼ」の用語が用いられるであろう。NADH-依存性及びNADPH-依存性グリセロール-3-リン酸デヒドロゲナーゼがNADH及びNADPHを互換的に用いることができるのが一般に実情なので（例えばg p s Aによりコードされる遺伝子により）、NADH-依存性及びNADPH-依存性グリセロール-3-リン酸デヒドロゲナーゼの用語は互換的に用いられるであろう。NADH-依存性酵素（E. C. 1. 1. 1. 8）は例えばGPD1（GenBank Z74071x2）又はGPD2（GenBank Z35169x1）又はGPD3（GenBank G984182）又はDAR1（GenBank Z74071x2）を含むいくつかの遺伝子によりコードされる。NADPH-依存性酵素（EC 1. 1. 1. 94）はg p s A（GenBank U321643、（cds 197911-196892）G466746及びL45246）によりコードされる。FAD-依存性酵素（EC 1. 1. 99. 5）はGUT2（GenBank Z47047x23）又はg1pD（GenBank G147838）又はg1pABC（GenBank M20938）によりコードされる（引用することによりその記載事項が本明細書の内容となるWO 9928480及びその中の引用文献を参照されたい）。

【0053】

「グリセロール-3-ホスファターゼ」、「s n-グリセロール-3-ホスファターゼ」又は「d, 1-グリセロールホスファターゼ」及び「G3Pホスファターゼ」という用語は、グリセロール-3-リン酸と水のグリセロールと無機リン酸塩への転換を触媒する酵素活性を担うポリペプチドを指す。G3Pホスファターゼは例えばGPP1（GenBank Z47047x125）又はGPP2（GenBank U18813x11）によりコードされる（引用することによりその記載事項が本明細書の内容となるWO 9928480及びその中の引用文献を参照されたい）。

【0054】

「グリセロールキナーゼ」という用語は、グルセロールとATPのグルセロール-3-リン酸とADPへの転換を触媒する酵素活性を担うポリペプチドを指す。高-エネルギーリン酸ドナーATPを生理学的代用物（例えばホスホエノールピルビン酸）により置き換えることができる。グリセロールキナーゼは例えばGUT1 (GenBank U11583 x 19) 及びg1pK (GenBank L19201) によりコードされる（引用することによりその記載事項が本明細書の内容となるWO 9928480及びその中の引用文献を参照されたい）。

【0055】

「グリセロールデヒドロゲナーゼ」という用語は、グリセロールのジヒドロキシアセトンへの（E. C. 1. 1. 1. 6）又はグリセロールのグリセルアルデヒドへの（E. C. 1. 1. 1. 72）の転換を触媒する酵素活性を担うポリペプチドを指す。グリセロールのジヒドロキシアセトンへの転換を触媒する酵素活性を担うポリペプチドは「ジヒドロキシアセトンレダクターゼ」とも言われる。グリセロールデヒドロゲナーゼはNADH（E. C. 1. 1. 1. 6）、NADPH（E. C. 1. 1. 1. 72）又は他の補因子（例えばE. C. 1. 1. 9. 22）に依存性であることができる。NADH-依存性グリセロールデヒドロゲナーゼは例えばg1dA (GenBank U00006) によりコードされる（引用することによりその記載事項が本明細書の内容となるWO 9928480及びその中の引用文献を参照されたい）。

【0056】

「デヒドラターゼ酵素」又は「デヒドラターゼ」という用語は、産物3-ヒドロキシプロピオナルデヒドへのグリセロール分子の転換を触媒する酵素活性を指す。本発明の目的の場合、デヒドラターゼ酵素はグリセロールデヒドラターゼ（E. C. 4. 2. 1. 30）及びジオールデヒドラターゼ（E. C. 4. 2. 1. 28）を含み、それぞれグリセロール及び1, 2-プロパンジオールの好ましい基質を有する。デヒドラターゼ酵素のための遺伝子はクレブシエラ・ニューモニアエ、シトロバクテル・フレウンジイ、クロスツリジウム・パステウリアヌ

ム、サルモネラ・チフィムリウム及びクレブシエラ・オキシトカにおいて同定されている。それぞれの場合にデヒドラターゼは3つのサブユニット：大もしくは「 α 」サブユニット、中もしくは「 β 」サブユニット及び小もしくは「 γ 」サブユニットから構成されている。文献中で用いられる遺伝子命名法が多様なので、同定を容易にするために比較チャートを表1に示す。遺伝子は例えばD a n i e l e t a l. (FEMS Microbiol. Rev. 22, 553 (1999)) 及びToraya and Mori (J. Biol. Chem. 274, 3372 (1999)) にも記載されている。表1を参照すると、グリセロールデヒドラターゼの大もしくは「 α 」サブユニットをコードする遺伝子はd h a B 1、g 1 d A及びd h a Bを含み；中もしくは「 β 」サブユニットをコードする遺伝子はd h a B 2、g 1 d B及びd h a Cを含み；小もしくは「 γ 」サブユニットをコードする遺伝子はd h a B 3、g 1 d C及びd h a Eを含む。やはり表1を参照すると、ジオールデヒドラターゼの大もしくは「 α 」サブユニットをコードする遺伝子はp d u C及びp d d Aを含み；中もしくは「 β 」サブユニットをコードする遺伝子はp d u D及びp d d Bを含み；小もしくは「 γ 」サブユニットをコードする遺伝子はp d u E及びp d d Cを含む。

【0057】

【表1】

表1 デヒドラターゼ及びビドラターゼ関連機能に関する遺伝子名及びGenBank参照の比較チャート
遺伝子機能:

調節		未知		再活性化		1,3-PDデヒドラターゼ		未知	
遺伝子	塩基対	遺伝子	塩基対	遺伝子	塩基対	遺伝子	塩基対	遺伝子	塩基対
生物(GenBank参照)									
K.ニューモニア (K.pneumoniae)(登録番号:1)	<i>dhaR</i>	2209-4134	<i>orfW</i>	4112-4642	<i>orfX</i>	4643-4996	<i>dhaT</i>	5017-6108	<i>orfY</i>
K.ニューモニア (K.pneumoniae)(U30903)		<i>orfZc</i>	7116-7646	<i>orfZb</i>	6762-7115	<i>dhaT</i>	5578-6741	<i>orfZa</i>	5125-5556
K.ニューモニア (K.pneumoniae)(U60992)				<i>gdtB</i>					
C.7フランジ (C.freundii)(U09771)	<i>dhaR</i>	3746-5671	<i>orfY</i>	5649-6179	<i>orfX</i>	6180-6533	<i>dhaT</i>	6550-7713	<i>orfY</i>
C.アスペルギラム (C.pasteuriatum)(AF051373)									
C.アスペルギラム (C.pasteuriatum)(AF008034)		<i>orfW</i>	210-731	<i>orfX</i>	1-196	<i>dhaT</i>	1232-2389	<i>orfY</i>	746-1177
S.フランジ (S.typhimurium)(AF026270)				<i>pdhH</i>	8274-8645				
K.オキシトカ (K.oxytoca)(AF017781)				<i>ddrB</i>	2083-2440				
K.オキシトカ (K.oxytoca)(AF051373)									
遺伝子機能:									
遺伝子	デヒドラターゼ, α	遺伝子	塩基対	遺伝子	塩基対	遺伝子	塩基対	遺伝子	塩基対
生物(GenBank参照)									
K.ニューモニア (K.pneumoniae)(登録番号:1)	<i>dhaB1</i>	7044-8711	<i>dhaB2</i>	8724-9308	<i>dhaB3</i>	9311-9736	<i>orfZ</i>	9749-11572	
K.ニューモニア (K.pneumoniae)(U30903)	<i>dhaB1</i>	3047-4714	<i>dhaB2</i>	2450-2890	<i>dhaB3</i>	2022-2447	<i>dhaB4</i>	186-2009	
K.ニューモニア (K.pneumoniae)(U60992)	<i>gdtA</i>	121-1788	<i>gdtB</i>	1801-2385	<i>gdtC</i>	2188-2813	<i>gdtD</i>		
C.7フランジ (C.freundii)(U09771)	<i>dhaB</i>	8556-10223	<i>dhaC</i>	10235-10819	<i>dhaE</i>	10822-11250	<i>orfZ</i>	11261-13072	
C.アスペルギラム (C.pasteuriatum)(AF051373)	<i>dhaB</i>	84-1748	<i>dhaC</i>	1779-2318	<i>dhaE</i>	2133-2773	<i>orfZ</i>	2790-4598	
C.アスペルギラム (C.pasteuriatum)(AF008034)									
S.フランジ (S.typhimurium)(AF026270)	<i>pdhC</i>	3557-5221	<i>pdhD</i>	5232-5906	<i>pdhE</i>	5921-6442	<i>pduG</i>	6452-6884	
K.オキシトカ (K.oxytoca)(AF017781)							<i>ddrA</i>	241-2073	
K.オキシトカ (K.oxytoca)(AF051373)	<i>pddA</i>	121-1785	<i>pddB</i>	1796-2470	<i>pddC</i>	2485-3006			

【0058】

グリセロール及びジオールデヒドラターゼはグリセロール及びいくつかの他の基質による機構に基づく自殺不活性化を受け易い (Daniel et al.

, FEMS Microbiol. Rev. 22, 553 (1999)。 「デヒドラターゼ再活性化因子」という用語は、デヒドラターゼ活性の再活性化を担うタンパク質を指す。「デヒドラターゼ再活性化活性」、「デヒドラターゼ活性の再活性化」又は「デヒドラターゼ活性の再生」という用語は、基質への触媒作用のできないデヒドラターゼを基質への触媒作用のできるものに転換する現象あるいはデヒドラターゼの不活性化を阻害する現象あるいは生体内におけるデヒドラターゼ酵素の有効半減期を延長する現象を指す。2つのタンパク質がデヒドラターゼ再活性化因子として含まれるものとして同定されている（引用することによりその記載事項が本明細書の内容となるWO 9821341 (US 6013494) 及びその中の引用文献；Daniel et al., 同上；Toraaya and Mori, J. Biol. Chem. 274, 3372 (1999)；及びTobimatsu et al., J. Bacteriol. 181, 4110 (1999) を参照されたい）。表1を参照すると、タンパク質の1つをコードする遺伝子はorfZ、dhAB4、gdrA、 pduG及びdrAを含む。やはり表1を参照すると、2つのタンパク質の第2のものをコードする遺伝子はorfX、orf2b、gdrB、 pduH及びddrBを含む。

【0059】

「1, 3-プロパンジオールオキシドレダクターゼ」、「1, 3-プロパンジオールデヒドロゲナーゼ」又は「DhAT」という用語は、3-HPAと1, 3-プロパンジオールの相互転換を触媒することができる酵素活性を担う単数もしくは複数のポリペプチドを指し、但し、そのような活性をコードする単数もしくは複数の遺伝子はその自然の（すなわち野生型の）背景（setting）においてデヒドラターゼ酵素に物理的又は転写的に結合していることが見いだされており；例えば該遺伝子はクレブシエラ・ニューモニアエからのdhATの場合にそうであるようにdhAレギュロン内で見いだされる。表1を参照すると、1, 3-プロパンジオールオキシドレダクターゼをコードする遺伝子はクレブシエラ・ニューモニアエ、シトロバクテル・フレウンジイ及びクロスツリジウム・パステウリアヌムからのdhATを含む。これらの遺伝子のそれぞれはI I I型アル

コールデヒドロゲナーゼの群に属するポリペプチドをコードし、保存された鉄-結合モチーフを示し、3-HPAと1, 3-プロパンジオールのNAD⁺/NA DH結合相互転換に関する優先性を有する (Johnson and Lin, J. Bacteriol. 169, 2050 (1987); Daniel et al., J. Bacteriol. 177, 2151 (1995); 及びLeurs et al., FEMS Microbiol. Lett. 154, 337 (1997))。類似の物理的性質を有する酵素がラクトバシルス・ブレビス及びラクトバシルス・ブクネリから単離されている (Veiga da Dunha and Foster, Appl. Environ. Microbiol. 58, 2005 (1992))。

【0060】

「dhaレギュロン」という用語は、デヒドラターゼ活性、再活性化活性及び1, 3-プロパンジオールオキシドレダクターゼを含むがこれらに限られない種々の生物学的活性をコードする1組の関連遺伝子又は読み取り枠を指す。典型的には、dhaレギュロンは本明細書に記載する読み取り枠dhaR, orfY, dhaT, orfX, orfW, dhaB1, dhaB2, dhaB3及びorfZを含む。

【0061】

「非-特異的触媒活性」という用語は、3-HPAと1, 3-プロパンジオールの相互転換を触媒するのに十分な酵素活性を担う単数もしくは複数のポリペプチドを指し、特に単数もしくは複数の1, 3-プロパンジオールオキシドレダクターゼを含む。典型的には、これらの酵素はアルコールデヒドロゲナーゼである。そのような酵素はNAD⁺/NADH以外の補因子を利用することができ、それらにはFAD又はFMNのようなフラビンが含まれるがこれらに限られない。単数もしくは複数の非-特異的アルコールデヒドロゲナーゼのための単数もしくは複数の遺伝子は、例えば微生物E. coli KLP23内で内因的にコードされ、且つ機能的に発現されることが見いだされる。

【0062】

「機能」又は「酵素機能」という用語は、特定の化学反応を行うために必要な

エネルギーの改変における酵素の触媒活性を指す。そのような活性を、適した条件下で産物又は基質のいずれかの生産が行われ得る平衡における反応に適用し得ることが理解される。

【0063】

「ポリペプチド」及び「タンパク質」という用語は互換的に用いられる。

【0064】

「炭素基質」及び「炭素源」という用語は、本発明の宿主微生物により代謝され得る炭素源、そして特に単糖類、オリゴ糖類、多糖類及び1-炭素基質又はそれらの混合物より成る群から選ばれる炭素源を指す。

【0065】

「宿主細胞」又は「宿主微生物」という用語は、異種遺伝子 (foreign or heterologous genes) を受容し、且つこれらの遺伝子を発現して活性な遺伝子産物を生産できる微生物を指す。

【0066】

「異種遺伝子 (foreign gene)」、「異種DNA (foreign DNA)」、「異種遺伝子 (heterologous gene)」及び「異種DNA (heterologous DNA)」という用語は、種々の手段により宿主微生物内に置かれた、1つの生物にとって自然である (native) 遺伝物質を指す。問題の遺伝子は自然に存在する遺伝子、突然変異遺伝子又は合成遺伝子であることができる。

【0067】

「形質転換」及び「トランスフェクション」という用語は、核酸の導入の後の細胞における新しい遺伝子の獲得を指す。獲得した遺伝子を染色体DNA中に組込むか、又は染色体外複製配列として導入することができる。「形質転換細胞」という用語は、形質転換の産物を指す。

【0068】

「遺伝的に改変された」という用語は、形質転換又は突然変異により遺伝物質を変更するプロセスを指す。

【0069】

「組換え微生物」及び「形質転換された宿主」という用語は、異種遺伝子又は同種遺伝子 (homologous genes) の余分のコピーを用いて形質転換された微生物を指す。本発明の組換え微生物は、適した炭素基質からの 1, 3-プロパンジオールの生産のためにグリセロール-3-リン酸デヒドロゲナーゼ (GPD1) 、グリセロール-3-ホスファターゼ (GPP2) 、グリセロールデヒドラターゼ (dh a B1, dh a B2 及び dh a B3) 、デヒドラターゼ再活性化因子 (orf Z 及び orf X) ならびに場合により 1, 3-プロパンジオールオキシドレダクターゼ (dh a T) をコードする異種遺伝子を発現する。好ましい態様は、これらの遺伝子を用いて形質転換されているが機能性 dh a T を欠いている E. コリである。開示する遺伝子ならびに特に単数もしくは複数の 1, 3-プロパンジオールオキシドレダクターゼ (dh a T) を除く 3-HPA 及び 1, 3-プロパンジオールの相互転換のための非一特異的触媒活性のための遺伝子を含有するように、E. コリ以外の宿主微生物を形質転換することもできる。

【0070】

「遺伝子」は、特定のタンパク質を発現する核酸フラグメントを指し、コード領域に先行する (5' 非コード) 及び続く (3' 非コード) 調節配列を含む。「自然の」及び「野生一型」という用語は、それ自身の調節配列を有して自然に存在する遺伝子を指す。

【0071】

「コード (encoding)」及び「コード (coding)」という用語は、遺伝子が転写及び翻訳の機構を介してアミノ酸配列を生産するプロセスを指す。特定のアミノ酸配列をコードするプロセスは、コードされるアミノ酸における変化を引き起こさない塩基の変化を含み得るDNA配列、あるいは1つもしくはそれより多くのアミノ酸を改変させ得るが、DNA配列によりコードされるタンパク質の機能性に影響しない塩基の変化を含むDNA配列を含むと理解される。従って本発明は特定の代表的配列以上のものを包含すると理解される。

【0072】

「単離された」という用語は、自然にはそれに伴っている少なくとも1つの成

分から取り出されるタンパク質又はDNA配列を指す。

【0073】

「単離された核酸分子」は、1本鎖もしくは2本鎖であり、場合により合成の、非天然の、もしくは改変されたヌクレオチド塩基を含有することができるRNAもしくはDNAのポリマーである。DNAのポリマーの形態における単離された核酸分子はcDNA、ゲノムDNA又は合成DNAの1つもしくはそれより多いセグメントを含み得る。

【0074】

「実質的に類似の」は、1つもしくはそれより多くのヌクレオチド塩基における変化が1つもしくはそれより多いアミノ酸の置換を生ずるが、DNA配列によりコードされるタンパク質の機能性に影響しない核酸分子を指す。「実質的に類似の」は、1つもしくはそれより多くのヌクレオチド塩基における変化がアンチセンス又は共一抑制法 (co-suppression technology) により、遺伝子発現の改変を媒介する核酸分子の能力に影響しない核酸分子も指す。「実質的に類似の」は、アンチセンスもしくは共一抑圧法による遺伝子発現の改変あるいは得られるタンパク質分子の機能性の改変を媒介する能力に関連して (vis-a-vis) 、得られる転写産物の機能性に実質的に影響しない、本発明の核酸分子の修正 (例えば1つもしくはそれより多いヌクレオチド塩基の欠失又は挿入) も指す。本発明は特定の代表的配列以上の物を包含する。

【0075】

例えば与えられる部位において化学的に同等のアミノ酸の生産を生ずるが、コードされるタンパク質の機能性に影響しない遺伝子における改変が普通であることは当該技術分野において周知である。本発明の目的のために、置換を以下の5つの群の1つ内における交換として定義する：

1. 小さい脂肪族の、非極性もしくはわずかに極性の残基：Ala、Ser、Thr (Pro, Gly)；
2. 極性の、負に帯電した残基及びそれらのアミド：Asp、Asn、Glu、Gln；
3. 極性の、正に帯電した残基：His、Arg、Lys；

4. 大きい脂肪族の、非極性残基: M e t、 L e u、 I l e、 V a l (C y s) ; 及び

5. 大きい芳香族残基: P h e、 T y r、 T r p。

【0076】

かくして疎水性アミノ酸であるアミノ酸アラニンのためのコドンは別のもつと疎水性の低い残基（例えばグリシン）あるいはもつと疎水性の高い残基（例えばバリン、ロイシンもしくはイソロイシン）をコードするコドンにより置換され得る。同様に、1つの負に帯電した残基の別のものために代わる置換（例えばグルタミン酸のために代わるアスパラギン酸）あるいは1つの正に帯電した残基の別のものために代わる置換（例えばアルギニンのために代わるリシン）を生ずる変化も機能的に同等の産物を生産すると予測され得る。

【0077】

多くの場合、タンパク質分子のN-末端及びC-末端部分の改変を生ずるヌクレオチド変化もタンパク質の活性を改変するとは予測されない。

【0078】

提案される修正のそれぞれは十分に当該技術分野における日常的熟練の範囲内であり、コードされる産物の生物学的活性の保持の決定もそうである。さらに熟練者には、本発明により包含される実質的に類似の配列が、緊縮条件 (0. 1 X S S C、 0. 1 % S D S、 65°Cならびに 2 X S S C、 0. 1 % S D S 及び続いて 0. 1 X S S C、 0. 1 % S D S を用いる洗浄) 下で本明細書に例示する配列とハイブリダイジェーションするそれらの能力によっても定義されることがわかる。本発明の好ましい実質的に類似の核酸フラグメントは、そのD N A配列が本明細書に報告する核酸フラグメントのD N A配列と少なくとも 80% 同じである核酸フラグメントである。より好ましい核酸フラグメントは、本明細書に報告する核酸フラグメントのD N A配列と少なくとも 90% 同じである。最も好ましいのは、本明細書に報告する核酸フラグメントのD N A配列と少なくとも 95% 同じ核酸フラグメントである。

【0079】

核酸フラグメントは、1本鎖形態の核酸フラグメントを適した温度及び溶液イ

オン強度の条件下で他の核酸フラグメントにアニーリングできる場合、cDNA、ゲノムDNA又はRNAのような別の核酸フラグメントに「ハイブリダイジェーション可能」である。ハイブリダイジェーション及び洗浄条件は周知であり、Sambrook, J., Fritsch, E. F. and Maniatis, T. Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor (1989)、特にその中のChapter 11及びTable 11. 1 (引用することによりその記載事項全体が本明細書の内容となる) に例示されている。温度及びイオン強度の条件はハイブリダイジェーションの「緊縮性」を決定する。相同核酸に関する予備的スクリーニングのために、55°のTmに対応する、例えば5XSSC、0.1%SDS、0.25%ミルク且つホルムアミドなし;あるいは30%ホルムアミド、5XSSC、0.5%SDSの低緊縮性ハイブリダイジェーション条件を用いることができる。中緊縮性ハイブリダイジェーション条件はもっと高いTm、例えば40%ホルムアミド及び5Xもしくは6XSSCに対応する。ハイブリダイジェーションは、2つの核酸が相補配列を含有することを必要とするが、ハイブリダイジェーションの緊縮性に依存して、塩基間のミスマッチが可能である。ハイブリダイジェーションする核酸のための適した緊縮性は、当該技術分野において周知の変数である核酸の長さ及び相補性の程度に依存する。2つのヌクレオチド配列の間の類似性又は相同性の程度が高い程、これらの配列を有する核酸のハイブリッドのためのTmの値が大きい。核酸ハイブリダイジェーションの相対的安定性 (より高いTmに対応する) は以下の順序で低下する: RNA:RNA、DNA:RNA、DNA:DNA。長さが100ヌクレオチドより長いハイブリッドのために、Tmを計算するための式が誘導されている (Sambrook et al., 同上, 9.50-9.51を参照されたい)。比較的短い核酸、すなわちオリゴヌクレオチドを用いるハイブリダイジェーションの場合、ミスマッチの位置がより重要となり、オリゴヌクレオチドの長さがその特異性を決定する (Sambrook et al., 同上, 9.50-9.51を参照されたい)。1つの態様において、ハイブリダ

イジエーション可能な核酸のための長さは少なくとも約10ヌクレオチドである。ハイブリダイジエーション可能な核酸のための好ましい最低の長さは少なくとも約15ヌクレオチド；より好ましくは少なくとも約20ヌクレオチドであり；そして最も好ましくは該長さは少なくとも30ヌクレオチドである。さらに熟練者には、温度及び洗浄溶液塩濃度をプローブの長さのような因子に従って必要通りに調整できることがわかるであろう。

【0080】

「実質的部分」は、当該技術分野における熟練者による配列の手動の評価又はコンピューター一自動化配列比較及びBLAST (Basic Local Alignment Search Tool; Altschul et al., J. Mol. Biol. 215: 403-410 (1993); www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/も参照されたい) のようなアルゴリズムを用いる同定により、ポリペプチド又は遺伝子の推定的同定を与えるのに十分なポリペプチドのアミノ酸配列又は遺伝子のヌクレオチド配列を含むアミノ酸又はヌクレオチド配列を指す。一般に、ポリペプチド又は核酸配列を既知のタンパク質又は遺伝子に相同であると推定的に同定するためには、10もしくはそれより多い連続アミノ酸又は30もしくはそれより多いヌクレオチドの配列が必要である。さらにヌクレオチド配列に関し、20～30の連続ヌクレオチドを含む遺伝子一特異的オリゴヌクレオチドプローブを、遺伝子同定の配列一依存的方法（例えばサザンハイブリダイジエーション）及び単離（例えばバクテリアコロニー又はバクテリオファージプレートのその場ハイブリダイジエーション）において用いることができる。さらに、12～15塩基の短いオリゴヌクレオチドをPCRにおける增幅プライマーとして用い、プライマーを含む特定の核酸分子を得ることができる。従って、ヌクレオチド配列の「実質的部分」は、配列を含む核酸分子の特異的同定及び／又は単離を与えるのに十分な配列を含む。本明細書は、1つもしくはそれより多い特定のタンパク質をコードする部分的もしくは完全なアミノ酸及びヌクレオチド配列を記載する。本明細書に報告する配列の恩恵を受ける熟練者は今や、当該技術分野における熟練者に既知の目的のために、開示される配列のすべて又は実質的部分を用いることができる。従って本発明は付

隨する配列表において報告する完全な配列ならびに上記で限定した配列の実質的部分を含む。

【0081】

「相補的」という用語は、互いにハイブリダイジェーションすることができるヌクレオチド塩基間の関係を記述する。例えばDNAに関し、アデノシンはチミンに相補的であり、シトシンはグアニンに相補的である。従って本発明は、付隨する配列表において報告する完全な配列ならびに実質的に類似の核酸配列に相補的である単離された核酸分子も含む。

【0082】

当該技術分野において既知の「パーセント同一性」という用語は、配列の比較により決定される2つもしくはそれより多くのポリペプチド配列又は2つもしくはそれより多くのポリヌクレオチド配列の間の関係である。当該技術分野において「同一性」も、場合次第でポリペプチドもしくはポリヌクレオチド配列の列（strings）の間の対合により決定されるポリペプチドもしくはポリヌクレオチド配列の間の配列関連性の程度を意味する。「同一性」及び「類似性」は既知の方法により容易に計算することができ、該方法には：Computational Molecular Biology；Lesk, A. M., Ed.；Oxford University Press: New York, 1988；Biocomputing: Informatics and Genome Projects；Smith, D. W., Ed.；Academic Press: New York, 1993；Computer Analysis of Sequence Data, Part I；Griffith, A. M. and Griffith, H. G., Eds；Humana Press: New Jersey, 1994；Sequence Analysis in Molecular Biology；von Heijne, G., Ed.；Academic Press: New York, 1987；及びSequence Analysis Primer；Gribskov, M. and Devereux, J., Eds.；Stockton Press: New York, 1991に記載されている方法が含まれるがこれらに限られない。同一

性の決定の好ましい方法は、調べられている配列の間の最大の対合を与えるように設計される。

【0083】

同一性及び類似性を決定する方法は公共的に入手可能なコンピュータープログラムにおいて系統化されている。2つの配列の間の同一性及び類似性を決定する好ましいコンピュータープログラム法には、ギャップクリエーションペナルティー (gap creation penalty) = 12 及びギャップエクステンションペナルティー (gap extension penalty) = 4 のそれらの標準的デフォルト値を有する Needleman and Wunsc h アルゴリズムを用いる GCG プログラムパッケージ中に存在する GCG Pileup プログラム (Devereux et al., Nucleic Acids Res. 12: 387-395 (1984)) 、 BLASTP、 BLASTN 及び FASTA (Pearson et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85: 2444-2448 (1988)) が含まれるがこれらに限られない。BLASTX プログラムは NCBI 及び他の供給源から公共的に入手可能である (BLAST Manual, Altschul et al., Natl. Cent. Biotechnol. Inf., Natl. Library Med. (NCBI NLM) NIH, Bethesda, Md. 20894; Altschul et al., J. Mol. Biol. 215: 403-410 (1990); Altschul et al., "Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs", Nucleic Acids Res. 25: 3389-3402 (1997))。パーセント同一性の決定のための他の好ましい方法は、 Jotun-Hein アルゴリズムを用いる DNASTAR タンパク質整列案の方法による (Hein et al., Methods Enzymol. 183: 626-645 (1990))。整列に関する Jotun-Hein 法のためのデフォルトパラメーターは: 複数の整列の場合、ギャップペナルティー (gap penalty) = 11 、ギャップレングスペナルティー (gap le

`ngth penalty) = 3` ; 対毎の整列の場合、`k tuple = 6` である。例えば、参照ヌクレオチド配列への少なくとも例えは 95% の「同一性」を有するヌクレオチド配列を有するポリヌクレオチドにより、ポリヌクレオチド配列が参照ヌクレオチド配列の各 100 ヌクレオチド当たりに最高で 5 つの点突然変異を含み得ることを除いて、ポリヌクレオチドのヌクレオチド配列が参照配列に同一であることを意味する。言い換えると、参照ヌクレオチド配列に少なくとも 95% 同一であるヌクレオチド配列を有するポリヌクレオチドを得るために、参照配列中のヌクレオチドの最高で 5% を欠失させるか、又は他のヌクレオチドで置換することができるか、あるいは参照配列中の合計ヌクレオチドの最高で 5% の数のヌクレオチドを参照配列中に挿入することができる。参照配列のこれらの突然変異は、参照ヌクレオチド配列の 5' もしくは 3' 末端位置、あるいはそれらの末端位置の間のどこかに、参照配列内で参照配列中のヌクレオチドの間に個別に、あるいは 1 つもしくはそれより多い連続した群として散らばって存在することができる。類似して、参照アミノ酸配列に少なくとも例えは 95% の同一性を有するアミノ酸配列を持つポリペプチドにより、ポリペプチド配列が参照アミノ酸の各 100 アミノ酸当たりに最高で 5 つのアミノ酸改変を含み得ることを除いて、ポリペプチドのアミノ酸配列が参照配列に同一であることを意味する。言い換えると、参照アミノ酸配列に少なくとも 95% 同一であるアミノ酸配列を有するポリペプチドを得るために、参照配列中のアミノ酸残基の最高で 5% を欠失させるか、又は他のアミノ酸で置換することができるか、あるいは参照配列中の合計アミノ酸残基の最高で 5% の数のアミノ酸を参照配列中に挿入することができる。参照配列のこれらの改変は、参照アミノ酸配列のアミノもしくはカルボキシ末端位置あるいはそれらの末端位置の間のどこかに、参照配列内で参照配列中の残基の間に個別に、又は 1 つもしくはそれより多い連続した群として散らばって存在することができる。

【0084】

「同種 (homologous)」という用語は、与えられる宿主細胞において本来の、又は自然に存在するタンパク質又はポリペプチドを指す。本発明は組換えDNA法を介して同種タンパク質を生産する微生物を含む。

【0085】

「パーセント相同性」という用語は、ポリペプチド間のアミノ酸配列同一性の程度を指す。第1のアミノ酸配列が第2のアミノ酸配列に同一である場合、第1及び第2のアミノ酸配列は100%の相同性を示す。2つのポリペプチド間の相同性は、両配列中の与えられる位置において対応するアミノ酸の合計数の一次関数であり、例えば2つの配列の両方におけるアミノ酸の合計数の半分が同じ場合、2つの配列は50%の相同性を示すと言われる。

【0086】

「コドン縮重」は、コードされるポリペプチドのアミノ酸配列に影響のないヌクレオチド配列の変動を許す遺伝コードにおける分岐進化 (divergence) を指す。従って本発明は、配列番号：57に示すアミノ酸配列のすべてもしくは実質的部分をコードするいずれの核酸分子にも関する。熟練者は、与えられるアミノ酸を特定するためのヌクレオチドコドンの使用において特定の宿主細胞により示される「コドンバイアス」を十分に承知している。従って宿主細胞における発現を向上させるために遺伝子を合成する場合、遺伝子のコドン使用の頻度が宿主細胞の好みのコドン使用の頻度に近づくように遺伝子を設計するのが望ましい。

【0087】

得られるタンパク質分子の機能性に実質的に影響しないサイレント変化 (silent changes) を生ずる配列における欠失、挿入又は置換のような配列への修正も意図されている。例えば遺伝コードの縮重を反映するか、又は与えられる部位において化学的に同等のアミノ酸の生産を生ずる遺伝子配列における改変が意図されている。かくして疎水性アミノ酸であるアミノ酸アラニンのためのコドンを、他の疎水性がより低い残基、例えばグリシン又はより疎水性の残基、例えばバリン、ロイシンもしくはイソロイシンをコードするコドンによって置換することができる。同様に、1つの負に帯電した残基の別のものために代わる置換、例えばグルタミン酸のために代わるアスパラギン酸の置換、あるいは1つの正に帯電した残基の別のものために代わる置換、例えばアルギニンのために代わるリシンの置換を生ずる変化も生物学的に同等の産物を生産すると予測

される。タンパク質分子のN-末端もしくはC-末端部分の改変を生ずるヌクレオチド変化もタンパク質の活性を改変するとは予測されない。いくつかの場合は、タンパク質の生物学的活性への改変の影響を研究するために、配列の突然変異体を作るのが実際に望ましいかも知れない。提案される修正のそれぞれは、十分に当該技術分野における日常的熟練の範囲内であり、コードされる産物における生物学的活性の保持の決定もそうである。さらに熟練者には、本発明により包含される配列が緊縮条件 (0.1 X S S C, 0.1 % S D S, 65°C) 下で本明細書に例示される配列とハイブリダイジェーションするそれらの能力によっても定義されることがわかる。

【0088】

「発現」という用語は、遺伝子産物の配列をコードする遺伝子からの遺伝子産物への転写及び翻訳を指す。

【0089】

「プラスミド」、「ベクター」及び「カセット」という用語は、多くの場合に細胞の中心代謝の一部ではなく、通常は環状2本鎖DNA分子の形態にある遺伝子を保有している染色体外要素を指す。そのような要素は、いずれかの源から誘導される1本ーもしくは2本鎖DNAもしくはRNAの線状もしくは環状の自律複製配列、ゲノム組込み配列、ファージ又はヌクレオチド配列であることができ、そこにおいては複数のヌクレオチド配列が適した3' 非翻訳配列と共に選ばれた遺伝子産物のためのプロモーターフラグメント及びDNA配列を細胞中に導入することができる独特の構造に結合もしくは組み合わされている。「形質転換カセット」は、異種遺伝子を含有し且つ異種遺伝子の他に特定の宿主細胞の形質転換を助長する要素を有している特異的 (specific) ベクターを指す。「発現カセット」は、異種遺伝子を含有し且つ異種遺伝子の他に異種宿主におけるその遺伝子の発現の増強を可能にする要素を有している特異的ベクターを指す。

組換え生物の構築

炭素基質の1, 3-プロパンジオールへの転換のための酵素的経路をコードするであろう必要な遺伝子を含有する組換え生物を、当該技術分野において周知の方法を用いて構築することができる。グリセロール-3-リン酸デヒドロゲナー

ゼ (G P D 1) 、グリセロール-3-ホスファターゼ (G P P 2) 、グリセロールデヒドラターゼ (d h a B 1、d h a B 2 及び d h a B 3) 、デヒドラターゼ再活性化因子 (o r f Z 及び o r f X) ならびに 1, 3-プロパンジオールオキシドレダクターゼ (d h a T) をコードする遺伝子をクレブシエラ又はサッカロミセスのような本来の宿主から単離し、E. コリ DH 5 α 、E C L 7 0 7、AA 2 0 0 又は K L P 2 3 のような宿主株の形質転換に用いた。

遺伝子の単離

バクテリアゲノムから所望の遺伝子を得る方法は、分子生物学の分野において普通であり且つ周知である。例えば遺伝子の配列が既知の場合、制限エンドヌクレアーゼ消化により適したゲノムライブラリを作り、所望の遺伝子配列に相補的なプローブを用いてスクリーニングすることができる。配列が単離されたら、ポリメラーゼ連鎖反応 (P C R) (U. S. 4, 683, 202) のような標準的プライマー指向増幅法 (p r i m e r d i r e c t e d a m p l i f i c a t i o n m e t h o d s) を用いてDNAを増幅し、適したベクターを用いる形質転換に適した量のDNAを得ることができる。

【0090】

あるいは又、ゲノムDNAの大きなセグメント (35~45 kb) がベクター中に詰込まれていることができるコスミドライブラリを作り、適した宿主の形質転換に用いることができる。コスミドベクターは大量のDNAを収容できる点で独特である。一般にコスミドベクターは、異種DNAの詰込み及び続く環状化に必要なc o s DNA配列の少なくとも1つのコピーを有する。これらのベクターはc o s 配列の他に、C o l E 1のような複製起点及びアンピシリン又はネオマイシンに対して耐性の遺伝子のような薬剤耐性マーカーも含有しているであろう。適したバクテリア宿主の形質転換のためのコスミドベクターの使用法は、引用することによりその記載事項が本明細書の内容となるS a m b r o o k, J. e t a l. , M o l e c u l a r C l o n i n g : A L a b o r a t o r y M a n u a l, Second Edition (1989) C o l d S p r i n g H a r b o r L a b o r a t o r y P r e s sに十分に記載されている。

【0091】

典型的には、コスミドをクローニングするために、適した制限エンドヌクレアーゼを用いて異種DNAを単離し、コスミドベクターのcos領域に隣接して連結する。線状化された異種DNAを含有するコスミドベクターを次いでバクテリオファージのようなDNA詰込み伝達体と反応させる。詰込みプロセスの間にcos部位は切断され、異種DNAが細菌ウイルス粒子の頭部内に詰込まれる。次いでこれらの粒子を用いてE.コリのような適した宿主細胞をトランスフェクションする。細胞中に注入されると、異種DNAはcos付着末端の影響下で環状化する。この方法で異種DNAの大きなセグメントを導入し、組換え宿主細胞において発現させることができる。

グリセロールデヒドラターゼ (dh a B 1、dh a B 2及びdh a B 3)、デヒドラターゼ再活性化因子 (orf Z及びorf X) ならびに 1, 3-プロパンジオールデヒドロゲナーゼ (dh a T) をコードする遺伝子の単離及びクローニング

本発明の範囲内でコスミドベクター及びコスミド形質転換法を用い、グリセロールを 1, 3-プロパンジオールに処理 (processing) することができる遺伝子を保有していることが既知のバクテリア属から、ゲノムDNAの大きなセグメントをクローニングした。特定的には、K.ニューモニアエからのゲノムDNAを当該技術分野において周知の方法により単離し、コスミドベクターSuper cos 1 中への挿入のために制限酵素 Sau 3 A を用いて消化し、Giga pack II 詰込み抽出物を用いて詰込んだ。ベクターの構築に続き、コスミドDNAを用いてE.コリ XL1-Blue MR 細胞を形質転換した。グリセロールの存在下で細胞を成長させ、1, 3-プロパンジオール生成に関して培地を分析することにより、グリセロールを 1, 3-プロパンジオールに転換する能力に関して形質転換細胞をスクリーニングした。

【0092】

1, 3-プロパンジオール陽性形質転換細胞の 2 つを分析し、コスミドを pKP1 及び pKP2 と命名した。DNA配列決定は、C.フレウンジイからのグリセロールデヒドラターゼ遺伝子への広範囲の相同性を明らかにし、これらの形質

転換細胞がグリセロールデヒドラターゼ遺伝子をコードするDNAを含有することを示した。他の1, 3-プロパンジオール陽性形質転換細胞を分析し、コスミドをpKP4及びpKP5と命名した。DNA配列決定は、これらのコスミドがジオールデヒドラターゼ遺伝子をコードするDNAを保有していることを明らかにした。

【0093】

本発明はクレブシェラコスミド内からの単離された遺伝子を使用しているが、デヒドラターゼ遺伝子及びデヒドラターゼ再活性化因子遺伝子の代替え的供給源には、これらに限られるわけではないがシトロバクテル、クロスツリジア及びサルモネラが含まれる（表1を参照されたい）。

G3PDH及びG3Pホスファターゼをコードする遺伝子

本発明は宿主細胞におけるG3PDH及びG3Pホスファターゼ活性の発現に適した遺伝子を提供する。

【0094】

G3PDHをコードする遺伝子は既知である。例えばGPD1はサッカロミセスから単離され、配列番号：53に示す塩基配列を有しており、配列番号：54に示すアミノ酸配列をコードする（Wang et al., 同上）。同様に、GPD2によりコードされるG3PDH活性もサッカロミセスから単離されている（Eriksson et al., Mol. Microbiol. 17, 95 (1995)）。

【0095】

本発明の目的のために、NADH-依存性G3PDH活性を担うポリペプチドをコードするいずれの遺伝子も適していることが意図されており、ここでその活性はジヒドロキシアセトンリン酸（DHAP）のグリセロール-3-リン酸（G3P）への転換を触媒することができる。さらに、遺伝子DAR1、GPD1、GPD2、GPD3及びgpsAに対応する、NADH-依存性G3PDH'sのアミノ酸配列をコードするいずれの遺伝子も本発明において機能性であろうことが意図されており、ここでそのアミノ酸配列は酵素の機能を改変しないアミノ酸置換、欠失もしくは付加を含むことができる。熟練者には、他の供給

源から単離されるG 3 P D Hをコードする遺伝子も本発明で用いるのに適しているであろうことがわかるであろう。G 3 P ホスファターゼをコードする遺伝子は既知である。例えばG P P 2はサッカロミセス・セレビシアエから単離され、配列番号：5 5により示される塩基配列を有しており、それは配列番号：5 6に示されるアミノ酸配列をコードする (Norbeck et al., J. Bio. Chem. 271, 13875 (1996))。

【0096】

本発明の目的のために、G 3 P ホスファターゼ活性をコードするいずれの遺伝子も方法において用いるのに適しており、ここでその活性はグリセロール-3-リン酸とH₂Oのグリセロールと無機リン酸塩への転換を触媒することができる。さらに、G 3 P ホスファターゼ酵素の機能を改変しないアミノ酸置換、欠失もしくは付加を包含するアミノ酸配列を含んで、遺伝子G P P 2及びG P P 1に対応するG 3 P ホスファターゼのアミノ酸配列をコードするいずれの遺伝子も本発明において機能性であろう。熟練者には、他の供給源から単離されるG 3 P ホスファターゼをコードする遺伝子も本発明で用いるのに適していることがわかるであろう。

宿主細胞

1, 3-プロパンジオールの組換え体生産のために適した宿主細胞は原核性又は真核性であることができ、1, 3-プロパンジオール経路のための活性な酵素を発現する宿主細胞の能力によってのみ制限されるであろう。適した宿主細胞はバクテリア、例えばシトロバクテル、エンテロバクテル、クロスツリジウム、クレブシエラ、アエロバクテル、ラクトバシルス、アスペルギルス、サッカロミセス、シゾサッカロミセス、チゴサッカロミセス、ピチア、クルイベロミセス、カシジダ、ハンセヌラ、デバリオミセス、ムコル、トルロプシス、メチロバクテル、エシェリキア、サルモネラ、バシルス、ストレプトミセス及びシュードモナスであろう。本発明において好ましいのはE. コリ、E. ブラッタエ (E. b l a t t a e)、クレブシエラ、シトロバクテル及びアエロバクテルである。

【0097】

以下の一般的案を用いることにより、微生物を高力価1, 3-プロパンジオー

ル生産者に転換することができる。

【0098】

1. 1～2Mの1, 3-プロパンジオールの存在下で毒性量もしくは阻害量の3-HPAの定常状態濃度を可能にする内因性d h a T-様活性の、宿主となる可能性のある生物中における存在を決定する。

【0099】

2. 宿主となる可能性のある生物中にそのような活性が存在したら、この活性を消失させるか、もしくは不活性化するために適した突然変異誘発を行う。非機能性もしくは消失したd h a T-様活性の確証は、1～2Mの1, 3-プロパンジオールの存在下における3-HPA堆積がないことにより検出され得る。

【0100】

3. a) グリセロールが炭素源でない場合、グリセロール生産、b) グリセロールデヒドラターゼ及び付随する保持システムのための適した遺伝子ならびにc) y q h Dを発現させる。

【0101】

ある微生物に関して扱われる必要がある考慮は、1, 3-プロパンジオール生産のための条件下における内因性d h a T-様酵素の発現もしくは抑制に関してである。これらにはグリセロール、グルコース又は嫌気性(anaerobics)の存在も含まれる。

ベクター及び発現カセット

本発明は、G 3 P D H、G 3 P ホスファターゼ、デヒドラターゼ及びデヒドラターゼ再活性化因子の適した宿主細胞中へのクローニング、形質転換及び発現に適した多様なベクターならびに形質転換及び発現カセットを提供する。適したベクターは用いられる微生物と適合性のものであろう。例えばバクテリア、ウィルス(例えばバクテリオファージT 7又はM-13由来ファージ)、コスミド、酵母又は植物から適したベクターを誘導することができる。そのようなベクターを得、用いるための案は当該技術分野における者に既知である(Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual-volumes 1, 2, 3 (Cold Spring

Harbor Laboratory : Cold Spring Harbor, NY, 1989)) 。

【0102】

典型的には、ベクター又はカセットは適した遺伝子の転写及び翻訳を支配する配列、選択マーカー及び自律複製又は染色体組込みを可能にする配列を含有する。適したベクターは転写開始調節を宿している遺伝子の領域5'及び転写の終結を調節するDNAフラグメントの領域3'を含む。両調節領域が、形質転換される宿主細胞に同種である遺伝子に由来する場合に最も好ましい。そのような調節領域は生産宿主として得られる特定の種に本来の(native)遺伝子に由来する必要はない。

【0103】

所望の宿主細胞中におけるG3PDH及びG3Pホスファターゼ遺伝子（それぞれDAR1及びGPP2）の発現を推進するのに有用な開始調節領域又はプロモーターは多数であり、当該技術分野における熟練者に良く知られている。これらの遺伝子を推進できる実質的にいずれのプロモーターも本発明に適しており、CYC1、HIS3、GAL1、GAL10、ADH1、PGK、PHO5、GAPDH、ADC1、TRP1、URA3、LEU2、ENO及びTP1（サッカロミセス中における発現に有用）；AOX1（ピチア中における発現に有用）；ならびにlac、trp、 λ P_L、 λ P_R、T7、tac及びtrc（E.コリ中における発現に有用）が含まれるがこれらに限られない。

【0104】

終結調節領域も好ましい宿主に本来の種々の遺伝子に由来し得る。場合により終結部位は不必要であり得る；しかしながら含まれるとしたらそれが最も好ましい。

【0105】

本酵素の有効な発現のために、発現が適したメッセンジャーRNAの形成を生ずるように、酵素をコードするDNAを開始コドンを介して選ばれた発現調節領域に操作可能に結合させる。

【0106】

本発明において特に有用なのはベクターpDT29及びpKP32であり、それらはpAH48と一緒に用いられるように設計されている。pDT29及びpKP32の本質的要素はクレブシエラ・ニューモニアエから単離されたdhaレギュロンに由来する。pDT29は、その配列が配列番号：1内に含有されているヌクレオチドである読み取り枠dhaR、orfY、dhaT、orfX、orfW、dhab1、dhab2及びdhab3を含有する。pKP32は同じ供給源からの、pDT29上に存在すると同じ読み取り枠の組を含有し、pKP32にはdhaTが欠けていることが異なる。pAH48は宿主細胞中にDAR1及びGPP2遺伝子を導入するために用いられる伝達体であり、さらに特定的にはサッカロミセス・セレビシアエから単離されるDAR1及びGPP2遺伝子を含む。

1, 3-プロパンジオールの生産のための適した宿主の形質転換及び遺伝子の発現

適したカセットが構築されると、それらは適した宿主細胞の形質転換に用いられる。G3PDH、G3Pホスファターゼ、デヒドラターゼ及びデヒドラターゼ再活性化因子をコードする遺伝子を含有するカセットの宿主細胞中への導入は既知の方法により、例えば形質転換（例えばカルシウム一透過細胞（calcium-permeabilized cell）、エレクトロポレーションを用いる）により、あるいは組換えファージウィルスを用いるトランスフェクションにより行うことができる（Sambrook et al., 同上）。

【0107】

本発明においては、一般的方法及び実施例に十分に記載する通り、カセットを用いてE.コリを形質転換した。

突然変異体

本方法が、例示する細胞の他に、1, 3-プロパンジオールの生産を増強するように特別に設計された1つもしくは複数の突然変異を有する細胞を利用できるであろうことが意図されている。通常は炭素供給材料を非一生産的経路に転じるか、あるいは有意なカタボライト抑制を示す細胞を、これらの表現型の欠点（phenotypic deficiencies）を避けるように突然変異させ

ることができた。例えば多くの野生型細胞は培地中のグルコース及び副産物からのカタボライト抑制を受け易く、グルコース抑制に対して耐性である1, 3-プロパンジオール生産の可能なこれらの野生型生物の突然変異株が本発明において特に有用であろうことが意図されている。

【0108】

突然変異体を作る方法は当該技術分野において普通且つ周知である。例えば野生型細胞を放射線又は化学的突然変異原のような多様な作因に暴露し、次いで所望の表現型に関してスクリーニングすることができる。放射線を介して突然変異を作る場合、紫外(UV)又は電離線を用いることができる。遺伝子突然変異のために適した短波UV波長は200nm～300nmの範囲内に含まれ、254nmが好ましいであろう。この波長内のUV線は主にグアニジン及びシトシンからアデニン及びチミジンまでの核酸配列内で変化を引き起こす。すべての細胞はほとんどのUV誘導突然変異を修復するDNA修復機構を有しているので、修復プロセスを中断させて有効な突然変異の数を最大にするためにカフェイン及び他の阻害剤のような試薬を加えることができる。300nm～400nm領域内の光を用いる長波UV突然変異も可能であるが、一般にDNAと相互作用するプロラレン染料のような種々の活性化剤と一緒に用いないと短波UV光程有効でない。化学的薬剤を用いる突然変異誘発も突然変異体の形成に有効であり、通常用いられる物質には非複製DNAに影響する化学品、例えばHNO₂及びNH₂OHならびに複製DNAに影響する薬剤、例えばフレームシフト突然変異を引き起こすことで注目され得るアクリジン染料が含まれる。放射線又は化学的薬剤を用いて突然変異体を作るための特定的方法は当該技術分野において十分に実証されている。例えば引用することによりその記載事項が本明細書の内容となるThomas D. Brock in Biotechnology: A Textbook of Industrial Microbiology, Second Edition (1989) Sinauer Associates, Inc., Sunderland, M. A. 又はDeshpande, Mukund V., Appl. Biochem. Biotechnol. 36, 227 (1992) を参照されたい。

【0109】

突然変異誘発が起った後、所望の表現型を有する突然変異体を種々の方法により選択することができる。所望の産物もしくは中間体を生産する能力に関して突然変異誘発された細胞を選択する場合、ランダムスクリーニングが最も普通である。あるいは又、突然変異誘発された集団を耐性のコロニーのみが成長できる選択培地上で成長させることにより、突然変異体の選択的単離を行うことができる。突然変異体選択の方法は高度に開発され、且つ工業的微生物学の分野において周知である。例えばB r o c k, 同上; DeManci l h a e t a l . , Food Chem. 14, 313 (1984) を参照されたい。

【0110】

望ましくない酵素活性の除去も酵素をコードする遺伝子の破壊により行うことができる。そのような方法は当該技術分野における熟練者に既知であり、実施例4及び実施例8で例示する。

1, 3-プロパンジオール生産経路における改変

代表的酵素経路。 グルコースからの1, 3-プロパンジオールの生産は以下の系列の段階により行われ得る。この系列は当該技術分野における熟練者に既知の複数の経路の代表であり、図5に示されている。1系列の段階においてグルコースが解糖経路の酵素によりジヒドロキシアセトンリン酸 (D H A P) と3-ホスホーグリセルアルデヒド (3-P G) に転換される。次いでD H A Pのジヒドロキシアセトン (D H A) への加水分解及び続く還元あるいはD H A Pのグリセロール3-リン酸 (G 3 P) への還元及び続く加水分解によりグリセロールが生成する。加水分解段階は、それらの基質に関して非一特異的であることが知られているいずれかの数の細胞ホスファターゼにより触媒され得るか、あるいは組換えにより活性を宿主中に導入することができる。還元段階はN A D⁺ (又はN A D P⁺) 結合宿主酵素により触媒され得るか、あるいは組換えにより宿主中に活性を導入することができる。d h a レギュロンが式3の可逆的反応を触媒するグリセロールデヒドロゲナーゼ (E. C. 1. 1. 1. 6) を含有することは注目に値する。

【0111】



上記で詳細に記載した通り、グリセロールは中間体3-ヒドロキシプロピオンアルデヒド(3-HPA)を介して1, 3-プロパンジオールに転換される。中間体3-HPAは宿主によりコードされ得るか、又は組換えにより宿主中に導入され得るデヒドラターゼ酵素によりグリセロールから生産される、式1。このデヒドラターゼはグリセロールデヒドラターゼ(E. C. 4. 2. 1. 30)、ジオールデヒドラターゼ(E. C. 4. 2. 1. 28)又はこの変換を触媒することができる他のいずれかの酵素であることができる。グリセロールデヒドラターゼはdhaレギュロンによりコードされるが、ジオールデヒドラターゼはコードされない。1, 3-プロパンジオールはNAD⁺-(もしくはNADP⁺)結合宿主酵素により3-HPAから生産されるか、あるいは組換えにより活性を宿主中に導入することができる、式2。1, 3-プロパンジオールの生産におけるこの最終的反応は1, 3-プロパンジオールデヒドロゲナーゼ(E. C. 1. 1. 1. 202)又は他のアルコールデヒドロゲナーゼにより触媒され得る。

炭素チャンネリングに影響する突然変異及び形質転換。 1, 3-プロパンジオール生産経路における変異を含む多様な突然変異微生物が本発明において有用であろう。例えばトリオースリン酸イソメラーゼ突然変異(tpi-)の本発明の微生物中への導入は、炭素チャンネリングにより性能を向上させるための突然変異の利用の例である。トリオースリン酸イソメラーゼはD A H P の3-ホスホグリセルアルデヒドへの転換を担う酵素であり、そのままではグルコースからグリセロール及び1, 3-プロパンジオールへの主経路からの炭素の流れの分岐を許す(図5)。かくして欠失突然変異(tpi-)は当該技術分野において記載されている効率を越えて所望の経路の全体的代謝効率を増強する。同様に、1, 3-プロパンジオール生産経路の中間体に関する別の経路を遮断する突然変異も本発明にとって有用であろう。例えばグリセロールキナーゼの除去はG 3 Pホスファターゼの作用によりG 3 Pから生成するグリセロールがATPを失ってG 3 Pに再転換されるのを妨げる(図5)。又、グリセロールデヒドロゲナーゼ(例え

ば g 1 d A) の除去は、NADH-依存性グリセロール-3-リン酸デヒドロゲナーゼの作用によりDHPから生成するグリセロールがジヒドロキシアセトンに転換されるのを妨げる(図5)。突然変異を構造遺伝子に向け、酵素活性の活性を損なうか、もしくは向上させることができるか、あるいはプロモーター領域及びリボソーム結合部位を含むを含む調節遺伝子に向け、酵素活性の発現レベルを調節することができる。

【0112】

かくして形質転換及び突然変異を組合せ、1, 3-プロパンジオール生産の増強のために特定の酵素活性を調節することが意図されている。かくして1, 3-プロパンジオールの生産を向上させる全細胞触媒の修正を予定する(anticipate)ことは本発明の範囲内である。

【0113】

本発明は、炭素の流れがグルコースからDHP、G3P、グリセロール、3-HPA及び最終的に1, 3-プロパンジオールに動く、糖基質からの1, 3-プロパンジオールの生産のための好ましい経路を利用する。本生産株は、炭素の非-生産的化合物への分岐を妨げる種々の欠失突然変異を導入することにより、経路の代謝効率を最大にするように操作されている。上記の通りグリセロールは、グリセロールデヒドロゲナーゼ又はグリセロールキナーゼを介するDHA又はG3Pへの変換により、3HPAへの転換から分岐させられ得る(図5)。従つて、本生産株はg1dA及びg1pK遺伝子における欠失突然変異を含有する。同様に、DHPはトリオースリン酸イソメラーゼによって3-PGに分岐させられ得、かくして本生産微生物はこの遺伝子における欠失突然変異も含有する。本方法にはさらにグリセロールの3HPAへの転換のためのデヒドラターゼ酵素も導入され、それはdhaレギュロンのorfX及びorfZによりコードされる再活性化因子と共同して機能する(図5)。3HPAの1, 3-プロパンジオールへの転換は典型的には1, 3-プロパンジオールオキシドレダクターゼを介して行われるが、本方法は最終的産物である1, 3-プロパンジオールのより高い力価及び収率を与える非-特異的触媒活性を利用する(図5)。そのような方法では、200g/Lの力価が期待される場合に少なくとも10g/Lの1, 3

—プロパンジオールの力価が達成される。

【0114】

あるいは又、1, 3—プロパンジオール生産のための改良法は基質としてグリセロール又はジヒドロキシアセトンを利用することができ、その場合経路は最後の3つの基質、グリセロール→3HPA→1, 3—プロパンジオールのみを含む。そのような方法では、非—特異的触媒活性（アルコールデヒドロゲナーゼであることが予測される）が支持されてオキシドレダクターゼがやはり排除されるが、欠失突然変異の必要は、培養にグリセロールを加えることのエネルギーの考慮により取り消される。そのような方法では、200g/Lの力価が期待される場合に少なくとも71g/Lの1, 3—プロパンジオールの力価が達成される。

【0115】

同様に、改良された1, 3—プロパンジオール生産者を作るために、dhaT活性の欠失又は突然変異により修正されている野生型微生物の突然変異体を提供することは、本発明の範囲内である。例えば自然にはdhaレギュロンのすべての要素を含有する微生物を操作し、1, 3—プロパンジオールオキシドレダクターゼ活性をコードするdhaT遺伝子を不活性化することができる。これらの微生物は、アルコールデヒドロゲナーゼであることが予測される内因性触媒活性の存在により媒介され、1, 3—プロパンジオールのより高い収率及び力価を与えるであろうことが予測される。そのような微生物の例にはクレブシエラ種、シトロバクテル種及びクロスツリジウム種が含まれるがこれらに限られない。

培地及び炭素基質

本発明における発酵培地は適した炭素基質を含有しなければならない。適した基質には单糖類、例えばグルコース及びフルクトース、オリゴ糖類、例えばラクトース又はスクロース、多糖類、例えば澱粉又はセルロースあるいはそれらの混合物ならびに再生可能な供給材料、例えばチーズホエー透過物、コーンスティープリカ（corn steep liquor）、てんさいの糖みつ及び大麦の麦芽からの非精製混合物が含まれ得るがこれらに限られない。さらに炭素基質は1—炭素基質、例えば二酸化炭素又はメタノールであることもでき、それに関しては重要生化学的中間体への代謝的転換が示されている。1炭素源（例えばメタ

ノール、ホルムアルデヒド又はギ酸塩) からのグリセロール生産はメチロトローフイースト (methylotrophic yeasts) (K. Yamada et al., Agric. Biol. Chem. 53 (2), 541-543 (1989)) 及びバクテリア (Hunter et al., Biochemistry 24, 4148-4155 (1985)) において報告されている。これらの微生物はメタンからギ酸塩までの酸化状態における範囲の 1 炭素化合物を同化し、グリセロールを生産することができる。炭素同化の経路はリブロース-1,5-リン酸を介するか、セリンを介するか、あるいはキシリロース-1,5-リン酸を介するものであることができる (Gottschalk, Bacteria 1 Metabolism, Second Edition, Springer-Verlag: New York (1986))。リブロース-1,5-リン酸経路は、6-炭素糖を生成するギ酸塩とリブロース-5-リン酸との縮合を含み、6-炭素糖はフルクトース及び結局は 3-炭素産物であるグリセルアルデヒド-3-リン酸となる。同様に、セリン経路は 1-炭素化合物をメチレンテトラヒドロフオレートを介して解糖経路中に同化する。

【0116】

1 及び 2 炭素基質の他に、メチロトローフ微生物は複数の他の炭素一含有化合物、例えばメチルアミン、グルコサミン及び多様なアミノ酸を代謝活性のために使用することも知られている。例えばメチロトローフ酵母はメチルアミンからの炭素を使用してトレハロース又はグリセロールを生成させることができている (Bellion et al., Microb. Growth C1 Compd., [Int. Symp.], 7th (1993), 415-32. Editor(s): Murrell, J. Collin; Kelly, Don P. Publisher: Intercept, Andover, UK)。同様に、カンジダの種々の種はアラニン又はオレイン酸を代謝するであろう (Sulte et al., Arch. Microbiol. 153 (5), 485-489 (1990))。従って、本発明で使用される炭素の源は多様な炭素一含有基質を含むことができ、微生物又はプロセスの選択のみによって制限されるであろうことが意図されている。

【0117】

上記で挙げた炭素基質及びそれらの混合物（共一供給材料）のすべてが本発明において適していることが意図されているが、好ましい炭素基質は、プロセスが内因性グリセロールを生産することを目的としている場合はグルコース、フルクトース、スクロース又はメタノールであり、プロセスがグリセロール又はジヒドロキシアセトン供給材料を予定している場合はグリセロール又はジヒドロキシアセトンである。

【0118】

発酵培地は、適した炭素源の他に適した無機物、塩、補因子、緩衝剤及び当該技術分野における熟練者に既知の、培養物の成長及び1, 3-プロパンジオール生産のために必要な酵素経路の促進に適した他の成分を含有しなければならない。Co (II) 塩及び／又はビタミンB₁₂ 又はそれらの前駆体が特に注目される。

【0119】

アデノシルコバラミン（補酵素B₁₂）はデヒドラターゼ活性のために必須の補因子である。補酵素B₁₂の合成は原核生物、例えばエシェリキア・グラッタエ、クレブシエラ種、シトロバクテル種及びクロスツリジウム種において見いだされ、そのいくつかは初めから該化合物を合成することができ、他は部分的反応を行うことができる。例えばE. コリはコリン環構造を組み立てることができないが、コビンアミドのコリノイドへの転換を触媒することができ、5'-デオキシアデノシル基を導入することができる。かくしてE. コリ発酵においては補酵素B₁₂前駆体、例えばビタミンB₁₂を与えることが必要であることが当該技術分野において既知である。

【0120】

E. コリ発酵へのビタミンB₁₂添加物は連続的に、一定の速度で、又は細胞塊の生成と符合するように段階的に（staged）加えることができるか、あるいは1つの、もしくは複数のボーラス添加物として加えることができる。細胞塊（OD 550）に供給されるビタミンB₁₂（mg）の好ましい比率は0.06～0.60である。細胞塊（OD 550）に供給されるビタミンB₁₂（mg）の最

も好ましい比率は0.12～0.48である。

【0121】

本発明の形質転換されたE.コリにはビタミンB₁₂が加えられるが、初めからB₁₂を合成できる他の微生物も適した生産細胞であり、これらの微生物へのB₁₂の添加は必要であろうことが意図されている。

培養条件：

典型的には、適した培地中において35℃で細胞を成長させる。本発明における好ましい成長培地は普通の商業的に調製される培地、例えばLuria-Bertani (LB) ブイヨン、Sabouraud Dextrose (SD) ブイヨン又はYeast 培地 (YM) ブイヨンである。他の限定された (defined)、又は合成の成長培地も用いることができ、特定の微生物の成長に適した培地は微生物学又は発酵科学の技術分野における熟練者に既知であろう。カタボライト抑制を直接もしくは間接的に調節することが知られている薬剤、例えばサイクリックアデノシン2'：3'—リン酸の使用を反応培地中に導入することもできる。同様に、1, 3-プロパンジオール生産の増強に導く酵素活性を調節することが知られている薬剤（例えばメチルビオローゲン）の使用を遺伝子操作と一緒に、もしくはその代りに用いることができる。

【0122】

発酵のために適したpH範囲はpH5.0～pH9.0であり、pH6.0～pH8.0が初期条件として好ましい。

【0123】

反応は好気的もしくは嫌気的条件下で行うことができ、嫌気的もしくは微好気的条件が好ましい。

【0124】

制限された、もしくは過剰の炭素供給材料、例えばグルコースを用いてフェード-バッチ発酵を行うことができる。

バッチ及び連続発酵：

本プロセスは発酵のバッチ法を用いる。古典的なバッチ発酵は、培地の組成が発酵の開始時に設定され、発酵の間に人工的な改変に合わない閉鎖系である。か

くして発酵の開始時に培地に所望の1種もしくは複数種の微生物を接種し、系に何も加えずに発酵を起こさせる。しかしながら、典型的には「バッヂ」発酵は炭素源の添加に関するバッヂであり、多くの場合、pH及び酸素濃度のような因子の制御における試みが成される。バッヂ系では、系の代謝産物及びバイオマス組成が発酵が止められる時点まで一定に変化する。バッヂ培養内では、細胞が静的誘導期を介して高成長対数期に、そして最後に成長速度が減じるか又は止まる定常期に加減する（moderate）。処理されないと、定常期における細胞は終局的に死ぬであろう。対数期における細胞は一般に最終的産物もしくは中間体の生産の大部分を担う。

【0125】

標準的バッヂ系への変法がフェドーバッヂ系である。フェドーバッヂ発酵法も本発明において適しており、発酵の進行と共に基質を増加させて加えることを除いて、典型的なバッヂ系を含んでいる。フェドーバッヂ系は、カタボライト抑制が細胞の代謝を阻害する傾向がある場合、及び培地中に限られた量の基質があることが望ましい場合に有用である。フェドーバッヂ系における実際の基質濃度の測定は困難であり、従って測定可能な因子、例えばpH、溶解酸素及びCO₂のような廃ガスの分圧の変化に基づいて見積もられる。バッヂ及びフェドーバッヂ発酵は当該技術分野において普通且つ周知であり、Block, 同上に例を見いだすことができる。

【0126】

本発明はバッヂ様式で行われるが、該方法を連続発酵法に適応させ得ることが意図されている。連続発酵は、限定された発酵培地がバイオリアクターに連続的に加えられ、等量の条件調節された培地（conditioned media）が処理のために同時に取り出される開放系である。連続発酵は一般に、細胞が主に対数期成長にある一定の高い密度に培養を保持する。

【0127】

連続発酵は、細胞成長又は最終的産物濃度に影響する1つの因子もしくはいくつかの因子の調節を可能にする。例えば1つの方法は炭素源又は窒素レベルのような制限栄養素を固定された比率に保持し、他のすべてのパラメーターの加減を

許すであろう。他の系では、培地の濁度により測定される細胞濃度を一定に保ちながら、成長に影響する複数の因子を連続的に変えることができる。連続系は定常状態成長条件を保持するように努め、かくして培地が取り出される故の細胞の損失を発酵における細胞成長速度に対して釣り合わせねばならない。連続発酵法のための栄養素及び成長因子の調節の方法ならびに産物生成の速度を最大にするための方法は工業的微生物学の技術分野において周知であり、多様な方法が Brock, 同上に詳細に記載されている。

【0128】

本発明をバッチ、フェドーバッチ又は連続法を用いて実行できること、ならびに発酵のいずれの既知の様式も適していることが意図されている。さらに、細胞を全細胞触媒として基質上に固定化し、1, 3-プロパンジオール生産のための発酵条件に供することができる事が意図されている。

1, 3-プロパンジオールの同定及び精製：

発酵培地からの1, 3-プロパンジオールの精製法は当該技術分野において既知である。例えば有機溶媒を用いる抽出、蒸留及びカラムクロマトグラフィーに反応混合物を供することにより、細胞培地からプロパンジオールを得ることができる (U. S. 5, 356, 812)。この方法のために特に優れた有機溶媒はシクロヘキサンである (U. S. 5, 008, 473)。

【0129】

培地を高圧液体クロマトグラフィー (HPLC) 分析にかけることにより、1, 3-プロパンジオールを直接同定することができる。本発明において好ましいのは、無勾配様式で0.01N硫酸の移動相を用いる分析的イオン交換カラム上で発酵培地を分析する方法である。

【0130】

【実施例】

一般的方法

リン酸化、連結及び形質転換のための方法は当該技術分野において周知である。以下の実施例において用いるのに適した方法は、Sambrook, J. et al., Molecular Cloning: A Laboratory

Manual, Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989) に見いだされ得る。

【0131】

バクテリア培養の保持及び成長に適した材料及び方法は当該技術分野において周知である。以下の実施例において用いるのに適した方法は、Manual of Methods for General Bacteriology (Philippe Gerhardt, R. G. E. Murray, Ralph N. Costilow, Eugene W. Nester, Willis A. Wood, Noel R. Krieg and G. Briggs Phillips, eds), American Society for Microbiology, Washington, D. C. (1994) 又はThomas D. Brock in Biotechnology: A Textbook of Industrial Microbiology, Second Edition (1989) Sinauer Associates, Inc., Sunderland, MAに見いだされ得る。バクテリア細胞の成長及び保持のために用いられるすべての試薬及び材料は、他にことわらない限り Aldrich Chemicals (Milwaukee, WI), DIFCO Laboratories (Detroit, MI)、GIBCO/BRL (Gaithersburg, MD) 又はSigma Chemical Company (St. Louis, MO) から得た。

【0132】

略字の意味は以下の通りである：「h」は単数もしくは複数の時 (hours) を意味し、「min」は単数もしくは複数の分を意味し、「sec」は単数もしくは複数の秒を意味し、「d」は単数もしくは複数の日を意味し、「mL」はミリリットルを意味し、「L」はリットルを意味し、50ampはmL当たりに50 μ gのアンピシリンを意味し、LB-50ampはmL当たりに50 μ gのアンピシリンを含有するLuria-Bertaniブイヨンを意味する。

【0133】

表中で以下の略字を用いる。「Con.」は転換率であり、「Sel.」は炭

素に基づく選択率であり、「n d」は検出されないである。

【0134】

以下の実施例において用いられる、及び構築される株及びベクターを下記のチャートに挙げる：

【0135】

【表2】

株/プラスミド	欠失	ORF/遺伝子
KLP23	<i>glcA</i> <i>glcK</i>	
RJ8m	<i>glcA</i> <i>glcK</i> <i>Tpi</i>	
pAH48		GPP2 DAR1
pDT29		<i>dhaR</i> <i>orfY</i> <i>dhaT</i> <i>orfX</i> <i>orfW</i> <i>dhaB1</i> <i>dhaB2</i> <i>dhaB3</i> <i>orfZ</i>
pKP32		<i>dhaR</i> <i>orfY</i> <i>orfX</i> <i>orfW</i> <i>dhaB1</i> <i>dhaB2</i> <i>dhaB3</i> <i>orfZ</i>

【0136】

酵素アッセイ

デヒドラターゼ酵素に関するアッセイ：

グリセロール又は1, 2-プロパンジオールを基質として用いて無一細胞抽出物中のデヒドラターゼ活性を決定した。典型的には、フレンチプレス及び続いで細胞デbrisの遠心を用いる細胞破壊により無一細胞抽出物を調製した。アルデヒドのメチルベンゾー-2-チアゾロンヒドラゾンとの反応に基づくアッセイはF

o r a g e a n d F o s t e r (B i o c h i m. B i o p h y s. A c t a 5 6 9, 2 4 9 (1 9 7 9)) に記載されている。

【0137】

H o n d a e t a l. (J. B a c t e r i o l. 1 4 3, 1 4 5 8 (1 9 8 0)) は、デヒドラターゼの再活性化を測定するアッセイを開示している。デヒドラターゼ活性はトルエン処理された全細胞において、A T P を用いて、及び用いずに、グリセロール又は1, 2-プロパンジオールを基質として用いて決定された。A T P を添加した産物生成対A T P を添加しない産物生成の比率により再活性化を決定した。産物生成（グリセロール又は1, 2-プロパンジオールを基質として用いる場合のそれぞれ3-H P A又はプロビオンアルデヒド）をH P L C を用いて直接、あるいはメチルベンゾー-2-チアゾロンヒドラゾン試薬を用いて間接的に測定した。あるいは又、N A D H 結合アルコールデヒドロゲナーゼを用いるアルデヒドのそのそれぞれのアルコールへの転換をカップリングさせ、N A D H の消失を監視することにより、産物生成を決定した。

1, 3-プロパンジオールオキシドレダクターゼに関するアッセイ：

1, 3-プロパンジオールデヒドロゲナーゼと呼ばれることもある1, 3-プロパンジオールオキシドレダクターゼの活性を、記載されている通りに (J o h n s o n a n d L i n, J. B a c t e r i o l. 1 6 9, 2 0 5 0 (1 9 8 7)) 、溶液中又はスラブゲル中で無-細胞抽出物に関し、1, 3-プロパンジオール及びN A D⁺を基質として用いて決定した。あるいは又、N A D H の消失により3-H P AとN A D Hの1, 3-プロパンジオールとN A D⁺への転換を決定した。スラブゲルアッセイは、サイズ分離のおかげで、1, 3-プロパンジオールオキシドレダクターゼ (d h a T) の活性を非-特異的アルコールデヒドロゲナーゼの活性と分離するという利点の可能性を有する。シトロバクテル・フレンジイ、クレブシエラ・ニューモニアエ及びクロスツリジウム・パステウリヌムからの1, 3-プロパンジオールオキシドレダクターゼ (d h a T) の本来の分子量は異常に大きく、3 3 0, 0 0 0 ~ 4 4 0, 0 0 0 ダルトンの大きさである。ラクトバシルス・ブレビス及びラクトバシルス・ブクネリは、既知の1, 3-プロパンジオールオキシドレダクターゼ (d h a T) の性質に類似の性質

を有するデヒドラターゼ関連1, 3-プロパンジオールオキシドレダクターゼを含有する。

グリセロール3-リン酸デヒドロゲナーゼ活性に関するアッセイ：

Bell et al. (J. Biol. Chem. 250, 7153 (1975)) により公開されている方法からの下記で修正する方法を用いた。この方法は、5 mM DTTを含む0.1M Tris/HCl、pH 7.5緩衝液中に0.2 mM NADH、2.0 mM ジヒドロキシアセトリン酸 (DHP) 及び酵素を含有するキュベット中で、1.0 mLの合計容積において30°Cで無一細胞抽出物試料をインキュベーションすることを含んだ。最初に酵素とNADHの反応のバックグラウンド速度を340 nmにおいて少なくとも3分間決定した。続いて第2の基質であるDHPを加え、時間を経た吸収の変化をさらに少なくとも3分間監視した。総速度からバックグラウンド速度を引き去ることによりG3PDH活性を限定した。

グリセロール-3-ホスファターゼ活性に関するアッセイ：

ビス-Tris 又はMES 及びマグネシウム緩衝液、pH 6.5 中で抽出物を有機ホスフェート基質と一緒にインキュベーションすることにより酵素活性に関するアッセイを行った。用いられた基質は $1-\alpha$ -グリセロールリン酸又はd, $1-\alpha$ -グリセロールリン酸であった。アッセイにおける試薬の最終的濃度は：緩衝液 (20 mM、ビス-Tris 又は50 mM MES) ; MgCl₂ (10 mM) ; 及び基質 (20 mM) である。試料中の合計タンパク質が低く、酸クエンチを用いて可視の沈殿が起こらない場合、キュベット中で簡単に試料をアッセイした。この方法は、20 mM 基質 (50 μ L、200 mM) 、50 mM MES、10 mM MgCl₂、pH 6.5 緩衝液を含有するキュベット中で酵素試料をインキュベーションすることを含んだ。最終的ホスファターゼアッセイ容積は0.5 mLであった。酵素-含有試料を反応混合物に加え；キュベットの内容物を混合し、次いでキュベットをT = 37°Cで5~120分間、循環水浴中に入れ、時間の長さは酵素試料におけるホスファターゼ活性が2~0.02 U/mLのどの範囲であるかに依存した。酸モリブデート試薬 (0.4 mL) の添加により酵素反応をクエンチングした。Fiske SubbaRow試薬 (0.1

mL) 及び蒸留水 (1. 5 mL) を加えた後、溶液を混合し、発色させた。完全に発色させるために10分の後、Cary 219 UV／可視分光光度計を用いて試料の吸収を660 nmで読んだ。無機リン酸塩原液 (0. 65 mM) を用い、0. 026～0. 130 μ モル/mLの範囲の最終的無機リン酸塩濃度を有する6つの標準を調製することにより作られた標準曲線に、放出された無機リン酸塩の量を比較した。

グリセロールキナーゼ活性に関するアッセイ：

適した量の酵素、典型的には無一細胞粗抽出物を、40 mM ATP、20 mM $MgSO_4$ 、21 mMの均一に¹³C標識されたグリセロール (99%、Cambridge Isotope Laboratories) 及び0. 1M Tris-HCl、pH 9を含有する反応混合物に、25°Cで75分間加えた。

¹³C-NMR (125 MHz) によりグリセロールのグリセロール3-リン酸への転換を検出した：グリセロール (63. 11 ppm, δ, J = 41 Hz) 及び7. 66 ppm, t, J = 41 Hz) ; グリセロール3-リン酸 (62. 93 ppm, δ, J = 41 Hz; 65. 31 ppm, br d, J = 43 Hz; 及び7. 66 ppm, dt, J = 6, 41 Hz)。

NADH-結合グリセロールデヒドロゲナーゼアッセイ：

E. コリ株からの無一細胞抽出物中のNADH-結合グリセロールデヒドロゲナーゼ活性 (gal dA) を、非-変性ポリアクリルアミドゲル電気泳動によるタンパク質分離の後に決定した。グリセロールとNAD⁺のジヒドロキシアセトンとNADHへの転換を、フェナジンメトサルフェート (PMS) を媒介物として用い、3-[4, 5-ジメチルチアゾール-2-イル]-2, 5-ジフェニルテトラゾリウムブロミド (MTT) の濃く着色したホルマザンへの転換とカップリングさせた (Tang et al., J. Bacteriol. 140, 182 (1997))。

【0138】

電気泳動は、未変性ゲル (Novex, San Diego, CAからの8～16% TG、1. 5 mm、15レーンゲル) を用いて標準的方法により、二重に行われた。50 mM Tris 又は炭酸カリウム緩衝液、pH 9を用いて10

分間、3回洗浄することにより、残留グリセロールをゲルから除去した。50mM Tris又は炭酸カリウム、pH9、60mg 硫酸アンモニウム、75mg NAD⁺、1.5mg MTT及び0.5mg PMSを含有する15mLのアッセイ溶液中で、グリセロール（約0.16Mの最終的濃度）を含む、及び含まない2重のゲルを展開（developed）した。

【0139】

ポリアクリルアミドゲル電気泳動に続き、精製されたK. ニューモニアエグリセロールデヒドロゲナーゼ（d h a D）に対して誘起されたポリクローナル抗体との反応により、E. コリ株中のNADH-結合グリセロールデヒドロゲナーゼ活性（g l d A）の存在又は不在も決定した。

1, 3-プロパンジオールの単離及び同定：

HPLCによりグリセロールの1, 3-プロパンジオールへの転換を監視した。分析は標準的方法及びクロマトグラフィーの技術分野における熟練者に利用可能な材料を用いて行われた。1つの適した方法は、UV（210nm）及びRI検出を用いるWaters Maxima 820 HPLCシステムを使用した。Shodex SH-1011P プレカラム（6mm x 50mm）が備えられ、50°Cで温度制御されたShodex SH-1011カラム（8mm x 300mm、Waters, Milford, MAから購入）上に、移動相として0.01N H₂SO₄を用い、0.5mL/分の流量で試料を注入した。定量的分析が望まれている場合、外部標準として既知量のトリメチル酢酸を用いて試料を調製した。典型的には、グルコース（RI検出）、グリセロール、1, 3-プロパンジオール（RI検出）及びトリメチル酢酸（UV及びRI検出）の保持時間は、それぞれ15.27分、20.67分、26.08分及び35.03分であった。

【0140】

GC/MSにより1, 3-プロパンジオールの生産を確認した。分析は標準的方法及びGC/MSの技術分野における熟練者に利用可能な材料を用いて行われた。1つの適した方法は、Hewlett Packard 5971 Series 質量選択的検出器（EI）及びHP-INNOWaxカラム（長さ30m

、内径0.25 mm、フィルム厚さ0.25ミクロン)に連結された Hewlett Packard 5890 Series II ガスクロマトグラフを用いた。生成した 1, 3-プロパンジオールの保持時間及び質量スペクトルを基準の 1, 3-プロパンジオール (m/e : 57, 58) のそれに比較した。

【0141】

GC/MS のための代わりの方法は試料の誘導体化を含んだ。1.0 mL の試料 (例えば培養上澄み液) に 30 μ L の濃 (70% v/v) 過塩素酸を加えた。混合の後、試料を凍結乾燥した。ビス (トリメチルシリル) トリフルオロアセトアミド: ピリジンの 1 : 1 混合物 (300 μ L) を凍結乾燥された材料に加え、激しく混合し、65°Cにおいて 1 時間置いた。遠心により不溶性材料を除いて試料を透明にした。得られる液体は 2 相に分かれ、その上方を分析に用いた。試料を DB-5 カラム (4.8 m、内径 0.25 mm、フィルム厚さ 0.25 μ m; J & W Scientific から) 上でクロマトグラフィーにかけ、培養上澄み液から得た 1, 3-プロパンジオール誘導体の保持時間及び質量スペクトルを基準の標準試料から得たそれに比較した。TMS-誘導体化 1, 3-プロパンジオールの質量スペクトルは 205、177、130 及び 115 AMU の特徴的イオンを含有する。

細胞ライシス:

発酵ブイヨン中の細胞外可溶性タンパク質濃度を測定することにより、細胞ライシスを見積もった。細胞を分離するために、発酵槽試料を卓上遠心機において遠心した (典型的には、Eppendorf, Model 5415C 微量遠心機において 12,000 rpm で 3~5 分)。得られる上澄み液を商業的に入手可能な試薬を用い、Bradford 法によってタンパク質濃度に関して分析した (Bio-Rad Protein Assay, Bio-Rad, Hercules, CA)。

生存率:

発酵槽から得た細胞を、非選択的 LB 寒天平板上で、適した希釀において平板培養することにより、細胞生存率を決定した。発酵槽ブイヨンの mL当たりの生存細胞を OD 550 (AU) で割った比率を用いることにより、発酵槽実験の

間で細胞生存率を比較した。

【0142】

実施例1

1, 3-プロパンジオールの発現のためのコスミドDNAを用いる

E. コリ宿主細胞のクローニング及び形質転換

培地:

1, 3-プロパンジオールを生産する能力に関するバクテリア形質転換細胞のスクリーニングにおいて、合成S12培地を用いた。S12培地は: 10 mM 硫酸アンモニウム、50 mM リン酸カリウム緩衝液、pH 7.0、2 mM MgCl₂、0.7 mM CaCl₂、50 μM MnCl₂、1 μM FeCl₃、1 μM ZnCl₁、1.7 μM CuSO₄、2.5 μM CoCl₂、2.4 μM Na₂MoO₄及び2 μM チアミン塩酸塩を含有する。

【0143】

成長及び発酵のために用いられる培地Aは: 10 mM 硫酸アンモニウム; 50 mM MOPS/KOH緩衝液、pH 7.5; 5 mM リン酸カリウム緩衝液、pH 7.5; 2 mM MgCl₂; 0.7 mM CaCl₂; 50 μM MnCl₂; 1 μM FeCl₃; 1 μM ZnCl₁; 1.72 μM CuSO₄; 2.53 μM CoCl₂; 2.42 μM Na₂MoO₄; 2 μM チアミン塩酸塩; 0.01% 酵母抽出物; 0.01% カザアミノ酸; 0.8 μg/mL ビタミンB₁₂; 及び50 μg/mL アンピシリンから成る。必要な場合、培地Aに0.2%のグリセロール又は0.2%のグリセロールと0.2%のD-グルコースを補足した。

細胞:

文献でK. アエロゲネス (K. aerogenes) 又はアエロバクテル・アエロゲネス (Aerobacter aerogenes) としても知られるクレブシエラ・ニューモニアエECL2106 (Ruch et al., J. Bacteriol. 124, 348 (1975)) をE. C. C. Lin (Harvard Medical School, Cambridge, MA) から入手し、実験室培養として保持した。

【0144】

クレブシエラ・ニューモニアエATCC 25955をAmerican Type Culture Collection (Manassas, VA) から購入した。

【0145】

E. コリDH5 α をGibco/BRLから購入し、グリセロール又はジオールデヒドラターゼ酵素をコードする遺伝子を含有する、クレブシエラ・ニューモニアエATCC 25955から単離されたコスミドDNAを用いて形質転換した。グリセロールデヒドラターゼを含有するコスミドをpKP1及びpKP2と同定し、ジオールデヒドラターゼ酵素を含有するコスミドをpKP4と同定した。形質転換されたDH5 α 細胞をDH5 α -pKP1、DH5 α -pKP2及びDH5 α -pKP4と同定した。

【0146】

E. コリECL707 (Spranger et al., J. Gen. Microbiol. 135, 1255 (1989)) をE. C. C. Lin (Harvard Medical School, Cambridge, MA) から入手し、同様にクレブシエラ・ニューモニアエからのコスミドDNAを用いて形質転換した。これらの形質転換細胞を、グリセロールデヒドラターゼ遺伝子を含有するECL707-pKP1及びECL707-pKP2ならびにジオールデヒドラターゼ遺伝子を含有するECL707-pKP4と同定した。

【0147】

tpi遺伝子における突然変異を含有するE. コリAA200 (Anderson et al., J. Gen. Microbiol. 62, 329 (1970)) をE. coli Genetic Stock Center, Yale University (New Haven, CT) から購入し、クレブシエラコスミドDNAを用いて形質転換し、グリセロールデヒドラターゼ遺伝子を含有する組換え微生物AA200-pKP1及びAA200-pKP2ならびにジオールデヒドラターゼ遺伝子を含有するAA200-pKP4を得た。

DH5 α :

K. ニューモニアエDNAを用いてトランスフェクションされたE. コリXL-Blue MRの約1,000のコロニーを含有する6つの形質転換平板を5mLのLB培地を用いて洗浄し、遠心した。バクテリアをペレット化し、5mL LB培地+グリセロール中に再懸濁させた。アリコート(50μL)を、0.2%グリセロール+mL当たりに400ngのビタミンB₁₂+0.001%酵母抽出物+50ampを含むS12合成培地を含有する15mLの管中に接種した。最上まで管を培地で満たし、パラフィルムでくるみ、30℃でインキュベーションした。48h後にわずかな濁りが観測された。78h及び132hにおいて上記の通りに産物分布に関して分析されたアリコートは1,3-プロパンジオールに関して陽性であり、後者の時点には増加した量の1,3-プロパンジオールを含有した。

【0148】

1,3-プロパンジオール生産に関して陽性の試験結果を与えたバクテリアを系列的に希釈し、シングルコロニーを単離するためにLB-50amp平板上に平板培養した。48のシングルコロニーを単離し、再度1,3-プロパンジオールの生産に関して調べた。6つの独立したクローンからコスミドDNAを単離し、E.コリ株DH5 α 中に形質転換した。形質転換細胞を再度1,3-プロパンジオールの生産に関して調べた。2つの形質転換細胞をさらに特性化し、DH5 α -pKP1及びDH5 α -pKP2と称した。

【0149】

pIBI31 (IBI Biosystem, New Haven, CT) 中にサブクローニングされたpKP1からの12.1kb EcoRI-SalI フラグメントを配列決定し、pHK28-26と命名した(配列番号: 1)。配列決定は、グリセロールデヒドラターゼをコードするdhaオペロン及び調節に必要な遺伝子の関連する読み取り枠の遺伝子座を明らかにした。配列番号: 1に言及すると、ジヒドロキシアセトンキナーゼをコードするdhaK1に関する読み取り枠のフラグメントが塩基1-399に見いだされ(相補配列(complement)) ; グリセロールデヒドロゲナーゼをコードする読み取り枠dhaDが塩基1010-2107に見いだされ; リプレッサーをコードする読み取り枠dha

Rが塩基2209-4134に見いだされ；未知の機能のタンパク質をコードする読み取り枠o r f Wが塩基4112-4642に見いだされ（相補配列）；デヒドラターゼ再活性化タンパク質をコードする読み取り枠o r f Xが塩基4643-4996に見いだされ（相補配列）；1, 3-プロパンジオールオキシドレダクターゼをコードする読み取り枠d h a Tが塩基5017-6180に見いだされ（相補配列）；未知の機能のタンパク質をコードする読み取り枠o r f Yが塩基6202-6630に見いだされ（相補配列）；アルファサブユニットグリセロールデヒドラターゼをコードする読み取り枠d h a B 1が塩基7044-8711に見いだされ；ベータサブユニットグリセロールデヒドラターゼをコードする読み取り枠d h a B 2が塩基8724-9308に見いだされ；ガンマサブユニットグリセロールデヒドラターゼをコードする読み取り枠d h a B 3が塩基9311-9736に見いだされ；デヒドラターゼ再活性化タンパク質をコードする読み取り枠d h a B Xが塩基9749-11572に見いだされ；グリセロール吸収促進タンパク質をコードするg 1 p Fに関する読み取り枠のフラグメントが塩基11626-12145に見いだされる。

【0150】

K. ニューモニアエからの詰込まれたコスミドDNAを用いてトランスフェクションされたE. コリXL1-BLue MRのシングルコロニーを200 μ LのS15培地（硫酸アンモニウム、10 mM；リン酸カリウム緩衝液、pH 7.0、1 mM；MOPS/KOH緩衝液、pH 7.0、50 mM；MgCl₂、2 mM；CaCl₂、0.7 mM；MnCl₂、50 μ M；FeCl₃、1 μ M；ZnCl₂、1 μ M；CuSO₄、1.72 μ M；CoCl₂、2.53 μ M；Na₂MoO₄、2.42 μ M；及びチアミン塩酸塩、2 μ M）+0.2%のグリセロール+400 ng/mLのビタミンB₁₂+0.001%の酵母抽出物+50 μ g/mLのアンピシリンを含有するミクロタイターウェル中に接種した。ミクロタイターウェルの他に、LB-50ampを含有するマスター平板にも接種した。96 h後、100 μ Lを採取し、0.2ミクロンナイロン膜フィルターを含有するRainin遠心管中で遠心した。バクテリアを保留し、濾液をHPLC分析のために処理した。約240のコロニーをスクリーニングした後に1, 3-プロ

パンジオール生産を示す陽性のクローンを同定した。3つの陽性のクローンを同定し、その中の2つをLB-50amp上で成長させ、その中の1つは成長させなかつた。LB-50amp上で成長した2つの陽性のクローンの1つから単離され、1, 3-プロパンジオールの生産に関して立証されたシングルコロニーをpKP4と称した。pKP4を含有するE.コリ株からコスミドDNAを単離し、E.コリ株DH5 α を形質転換した。DH5 α -pKP4と称される独立した形質転換細胞を1, 3-プロパンジオールの生産に関して立証した。

ECL707:

E.コリ株ECL707をpKP1、pKP2、pKP4の1つに対応するコスミドK.ニューモニアエDNA又はSupercosベクターのみを用いて形質転換し、それぞれECL707-pKP1、ECL707-pKP2、ECL707-pKP4及びECL707-scと命名した。ECL707は、それぞれATP-依存性グリセロールキナーゼ、NAD⁺-結合グリセロールデヒドロゲナーゼ及びホスホエノールピルビン酸-依存性ホスホトランスフェラーゼシステムのジヒドロキシアセトンのための酵素IIをコードするg1pK、g1d及びp1sDが欠失している。

【0151】

LB-50amp平板から単離された、それぞれのコスミド形質転換の20のシングルコロニー及びSupercosベクターのみ（負の対照標準）の形質転換の5つのシングルコロニーをマスターLB-50amp平板に移した。これらの単離物を、それらがデヒドラターゼ活性を含有しているかどうかを決定するために、グリセロールを1, 3-プロパンジオールに転換するそれらの能力に關しても調べた。無菌のつまようじを用い、0.2%のグリセロール又は0.2%のグリセロールと0.2%D-グルコースが補足された200 μ Lの培地Aを含有するミクロタイマー平板に形質転換細胞を移した。30℃における48hの間のインキュベーションの後、ミクロタイマー平板ウェルの内容物を0.45ミクロンナイロンフィルターを介して濾過し、HPLCによりクロマトグラフィーにかけた。これらの試験の結果を表2に示す。

【0152】

【表3】

表2

形質転換されたECL707によるグリセロールの1,3-プロパンジオールへの転換

形質転換	グリセロール*	グリセロールとグルコース*
ECL707-pKP1	19/20	19/20
ECL707-pKP2	18/20	20/20
ECL707-pKP4	0/20	20/20
ECL707-sc	0/5	0/5

*(陽性単離物の数/調べた単離物の数)

【0153】

AA200:

E. コリ株AA200をpKP1、pKP2、pKP4の1つに対応するコスミドK.ニューモニアエDNA及びSupercosベクターのみを用いて形質転換し、それぞれAA200-pKP1、AA200-pKP2、AA200-pKP4及びAA200-scと命名した。株AA200はトリオースリン酸イソメラーゼが欠失している(tpi⁻)。

【0154】

E. コリ株ECL707に関して記載した通り、それぞれのコスミド形質転換の20のシングルコロニー及びエンプティーベクター形質転換の5つのシングルコロニーを単離し、グリセロールを1, 3-プロパンジオールに転換するそれらの能力に関して調べた。これらの試験の結果を表3に示す。

【0155】

【表4】

表3

形質転換されたAA200によるグリセロールの1,3-プロパンジオールへの転換

形質転換	グリセロール*	グリセロールとグルコース*
AA200-pKP1	17/20	17/20
AA200-pKP2	17/20	17/20
AA200-pKP4	2/20	16/20
AA200-sc	0/5	0/5

*(陽性単離物の数/調べた単離物の数)

【0156】

実施例2

グルコースからのグリセロールの生産のための

E. コリFM5のグリセロールキナーゼ突然変異体の操作 (engineering)

E. コリFM5におけるグリセロールキナーゼ遺伝子置換のための組込みプラスミドの構築:

Puregene DNA Isolation Kit (Gentra Systems, Minneapolis, MN) を用いてE. コリFM5 (ATCC 53911) ゲノムDNAを調製した。部分的g1pF及びグリセロールキナーゼ (g1pK) 遺伝子を含有する1.0kbのDNAフラグメントをFM5ゲノムDNAから、プライマー配列番号：2及び配列番号：3を用い、PCR (Mullis and Faloona, Methods Enzymol. 155, 335 (1987)) により増幅した。部分的g1pK及びg1pX遺伝子を含有する1.1kbのDNAフラグメントをFM5ゲノムDNAから、プライマー配列番号：4及び配列番号：5を用い、PCRにより増幅した。プライマー配列番号：4中にMun I部位を導入した。プライマー配列番号：4の5'末端はプライマー配列番号：3の逆相補配列であり、続くオーバーラップエクステンションPCR (overlap extension PCR) を可能にした。オーバーラップエクステンション法 (Horton et al., Bio Techniques 8, 528 (1990)) による遺伝子スプライシング

グを用い、鋳型としての上記の2つのPCRフラグメント及びプライマー配列番号：2及び配列番号：5を用いるPCRによって2. 1 kbのフラグメントを形成した。このフラグメントは1. 5 kbのg1pK遺伝子の中心領域からの0. 8 kbの欠失を示した。全体として、このフラグメントはMun Iクローニング部位（部分的g1pK内）の両側上に1. 0 kb及び1. 1 kbのフランкиング領域を有し、相同的組換えによる染色体遺伝子置換を可能にした。

【0157】

上記の2. 1 kbのPCRフラグメントを平滑末端化し（ムングビーンヌクレアーゼ（mung bean nuclelease）を用いて）、Zero Blunt PCR Cloning Kit（Invitrogen, San Diego, CA）を用いてpCR-Bluntベクター中にクロヘニングし、カナマイシン及びゼオシン耐性遺伝子を含有する5. 6 kbのプラスミドpRN100を得た。バクテリオファージP1-loxP部位（Snaithe et al., Gene 166, 173 (1995)）によりフランкиングされたクロラムフェニコール耐性遺伝子を含有するpLoxCat1からの1. 2 kbのHinc IIフラグメント（未公開の結果）を用い、プラスミドpRN100中のg1pKフラグメントを、それをMun I一消化された（且つ平滑末端化された）プラスミドpRN100に連結することにより分断し、6. 9 kbのプラスミドpRN101-1を得た。R6K起点を含有する376 bpのフラグメントを、プライマー配列番号：6及び配列番号：7を用いてベクターpGP704（Miller and Mekalanos, J. Bacteriol. 170, 2575-2583 (1988)）からPCRにより増幅し、平滑末端化し、pRN101-1からの5. 3 kbのAsp718-AattIIフラグメント（平滑末端化された）に連結し、カナマイシン及びクロラムフェニコール耐性遺伝子を含有する5. 7 kbのプラスミドpRN102-1を得た。pRN102-1の形成のための、R6K起点を用いるpRN101-1中のCoe1起点領域の置換は、ほとんどのゼオシン耐性遺伝子の欠失も含んだ。pRN102-1複製のための宿主は、R6K起点の機能のために必要なpir遺伝子を含有するE. コリSY327 (Miller and Mekalanos, J. Bact.

teriorol. 170, 2575-2583 (1988) であった。

クロラムフェニコール耐性遺伝子分断 (interrupt) を有するグリセロールキナーゼ突然変異体R J F 10mの操作 :

E. コリ FM5 を非一複製組込みプラスミド p R N 102-1 を用いて電気形質転換し (electrotransformed) 、クロラムフェニコール耐性 (12. 5 μ L/mL) 及びカナマイシン感受性 (30 μ g/mL) である形質転換細胞をさらに 1 mM のグリセロールを含有する M9 最少培地上で、グリセロール非一使用 (non-utilization) に関してスクリーニングした。1つのそのような突然変異体、R J F 10m からのゲノムDNA の Eco RI 消化は、サザン分析 (Southern, J. Mol. Biol. 98, 503-517 (1975)) を介して無損傷の g 1 p K 遺伝子を用いて精査すると、それが二重一交差組込み体 (double-crossover in integrant) (g 1 p K 遺伝子置換) であることを示し、それはクロラムフェニコール耐性遺伝子内における追加の Eco RI 部位の存在のおかげで、2つの予測される 7. 9 kb 及び 2. 0 kb バンドが観察されたからである。野生型対照標準は1つの予測された 9. 4 kb バンドを与えた。突然変異体 R J F 10m の ¹³C NMR 分析は、それが ¹³C-標識されたグリセロールと ATP をグリセロール-3-リン酸に転換できないことを確証した。この g 1 p K 突然変異体をさらに、プライマーの組合せ、配列番号：8 と配列番号：9、配列番号：10 と配列番号：11 及び配列番号：8 と配列番号：11 を用いるゲノム PCR により分析し、それらはそれぞれ予測される 2. 3 kb、2. 4 kb 及び 4. 0 kb の PCR フラグメントを与えた。野生型対照標準は、プライマー配列番号：8 及び配列番号：11 を用い、予測される 3. 5 kb のバンドを与えた。g 1 p K 突然変異体 R J F 10m をプラスミド p AH 48 を用いて電気形質転換し、グルコースからのグリセロール生産を可能にした。g 1 p K 突然変異体、E. コリ R J F 10m を 1997 年 11 月 24 日に、Budapest 条約の協約下に、ATC C に寄託した。

クロラムフェニコール耐性遺伝子分断が除去されたグリセロールキナーゼ突然変異体 R J F 10 の操作 :

YENB培地 (0. 75% 酵母抽出物、0. 8% 栄養ブイヨン) 上で37°Cにおいて終夜成長させた後、IPTG-誘導lacUV5プロモーターの調節下のバクテリオファージP1 Creリコンビナーゼ遺伝子、温度-感受性pSC101レプリコン及びアンピシリン耐性遺伝子を含有するプラスミドpJW168 (未公開の結果) を用い、水懸濁液中のE. coli R J F 10mを電気形質転換した。SOC培地中で30°Cにおいて発芽後成長させ、カルベニシリン (50 μg/mL) 及びIPTG (1mM) が補足されたLB寒天培地上で30°C (pJW168複製のために許される温度) において、形質転換細胞を選択した。Creリコンビナーゼにより媒介されるloxP部位における組換えを介する染色体クロラムフェニコール耐性遺伝子の切除を可能にするために、カルベニシリン及びIPTGが補足された新しいLB寒天培地上で30°Cにおいて、プールされたコロニーの2回連続終夜転移を行った (Hoess and Abramson, J. Mol. Biol. 181, 351-362 (1985))。得られるコロニーをカルベニシリン及びIPTGが補足されたLB寒天培地ならびにクロラムフェニコール (12.5 μg/mL) が補足されたLB寒天上にレプリカ平板培養し、カルベニシリン耐性且つクロラムフェニコール感受性で、マーカー遺伝子の除去を示すコロニーを同定した。1つのそのようなコロニーの終夜30°C培養物を用い、10mLのLB培地に接種した。30°Cで0.6AUのOD (600nm) まで成長させ、培養物を37°Cで終夜インキュベーションした。いくつかの希釀物をあらかじめ温められたLB寒天培地上で平板培養し、平板を42°C (pJW168複製のために許されない温度) で終夜インキュベーションした。得られるコロニーをLB寒天培地及びカルベニシリン (75 μg/mL) が補足されたLB寒天培地上にレプリカ平板培養し、カルベニシリン感受性であり、プラスミドpJW168の喪失を示すコロニーを同定した。1つのそのようなg1pK突然変異体、R J F 10をプライマー配列番号: 8及び配列番号: 11を用いるゲノムPCRによりさらに分析し、予測される3.0kbバンドを得、マーカー遺伝子の切除を確証した。1mMグリセロールを含有するM9最少培地上で成長しないことにより、突然変異体R J F 10によるグリセロール非一使用が確証された。g1pK突然変異体R J F 10をプラスミドpAH48を用

いて電気形質転換し、グルコースからのグリセロール生産を可能にした。

【0158】

実施例3

g 1 d A遺伝子ノックアウト (knockout) を有するE. コリ株の構築

それぞれ末端Sph1及びXba1部位が導入されたプライマー配列番号：12及び配列番号：13を用いるPCR (K. B. Mullis and F. A. Faloon, Meth. Enzymol. 155, 335-350 (1987))によりE. コリからg 1 d A遺伝子を単離し、pUC18中のSph1及びXba1部位の間にクローニングし (T. Maniatis (1982) Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor, Cold Spring Harbor, NY)、pKP8を形成した。pKP8をg 1 d A遺伝子内のユニークSal1及びNco1部位において切断し、末端をKlenowを用いて平滑化し、連結し、g 1 d Aの中間における109bpsの欠失及びユニークSal1部位の再生を生じ、pKP9を形成した。カナマイシン耐性を与える遺伝子(kan)を含有し、翻訳開始コドンの上流に約400bpsのDNA及び翻訳停止コドンの下流に約100bpsのDNAを含む1.4kbのDNAフラグメントを、末端Sal1部位が導入されたプライマー配列番号：14及び配列番号：15を用いるPCRによりpET-28a (+) (Novagen, Madison, Wis.) から単離し、pKP9のユニークSal1部位中にサブクローニングし、pKP13を形成した。g 1 d A翻訳開始コドンの204bps下流で始まり、g 1 d A翻訳停止コドンの178bps上流で終わり、kan挿入片を含有する2.1kbのDNAフラグメントを、それぞれ末端Sph1及びXba1部位が導入されたプライマー配列番号：16及び配列番号：17を用いるPCRによりpKP13から単離し、pMAK705 (Genencor International, Palo Alto, CA) 中のSph1及びXba1部位の間にサブクローニングし、pMP33を形成した。pMP33を用いてE. コリF M5を形質転換し、pMAK705複製のために許される温度である30°Cで20μg/mLのkan上において選択した。20μg/mLのkanが補足され

た液体培地中で30°Cにおいて、1つのコロニーを終夜拡大させた（expanded）。約32,000の細胞を20μg/mLのkan上で平板培養し、pMAK705複製のための制限温度である44°Cにおいて16時間インキュベーションした。44°Cで成長する形質転換細胞は染色体中に組込まれたプラスミドを有し、約0.0001の頻度で存在する。PCR及びサザンプロット（E. M. Southern, J. Mol. Biol. 98, 503-517 (1975)）分析を用い、形質転換細胞における染色体組込み結果（event）の性質を決定した。ウェスタンプロット分析（Towbin et al., Proc. Natl. Acad. Sci. 76, 4350 (1979)）を用い、gldAの産物であるグリセロールデヒドロゲナーゼタンパク質が形質転換細胞中で生産されるかどうかを決定した。活性アッセイを用い、グリセロールデヒドロゲナーゼ活性が形質転換細胞中に残っているかどうかを決定した。フェナジンメトサルフェートを媒介物として用い、グリセロールとNAD⁺のジヒドロキシアセトンとNADHへの転換をテトラゾリウム色素、MTT [3-(4,5-ジメチルチアゾール-2-イル)-2,5-ジフェニルテトラゾリウムブロミド] の濃く着色するホルマザンへの転換にカップリングさせることにより、未変性ゲル上のグリセロールデヒドロゲナーゼバンドにおける活性を決定した。グリセロールデヒドロゲナーゼは30mM 硫酸アンモニウム及び100mM Tris、pH 9の存在も必要とする（Tang et al., J. Bacteriol. 140, 182 (1997)）。分析された8つの形質転換細胞の中で6つがgldAノックアウトであると決定された。E. コリMSP33.6を1997年11月24日に、ブタペスト条約の協約下に、ATCCに寄託した。

【0159】

実施例4

g1pK及びg1dA遺伝子ノックアウトを有するE. コリ株の構築

g1dA遺伝子を含有し、翻訳開始コドンの上流に228bpのDNA及び翻訳停止コドンの下流に220bpのDNAを含む1.6kbのDNAフラグメントを、それぞれ末端Sph1及びXba1部位が導入されたプライマー配列番号：18及び配列番号：19を用いるPCRによりE. コリから単離し、pU

C18のSph1及びXba1部位の間にクローニングし、pQN2を形成した。pQN2をg1dA遺伝子内のユニークSal1及びNco1部位において切断し、末端をKlenowを用いて平滑化し、連結し、g1dAの中間における109bpの欠失及びユニークSal1部位の再生を生じ、pQNを形成した。カナマイシン耐性を与える遺伝子(kan)を含有し、loxP部位によりフランкиングされた1.2kbのDNAフラグメントをpLoxKan2(Genencor International, Palo Alto, CA)からStu1/Xholフラグメントとして単離し、Klenowを用いて末端を平滑化し、pQN4中に、Klenowを用いる平滑化の後にSal1部位においてサブクローニングし、pQN8を形成した。R6K複製起点を含有する0.4kbのDNAフラグメントを、それぞれ末端Sph1及びXba1部位が導入されたプライマー配列番号：20及び配列番号：21を用いるPCRによりpGP704(Miller and Mekalanos, J. Bacteriol. 170, 2575-2583 (1988))から単離し、pQN8からのg1dA::kanカセットを含有する2.8kbのSph1/Xba1 DNAフラグメントに連結し、pKP22を形成した。クロラムフェニコール耐性を与える遺伝子(cam)を含有し、loxP部位によりフランкиングされた1.0kbのDNAフラグメントを、pLoxCat2(Genencor International, Palo Alto, CA)からXba1フラグメントとして単離し、pKP22中にXba1部位においてサブクローニングし、pKP23を形成した。g1pK-であるE.コリ株RJF10(実施例2を参照されたい)をpKP23を用いて形質転換し、表現型kanRcamSを有する形質転換細胞を単離し、二重交差組込みを示し、それをサザンプロット分析により確認した。グリセロールデヒドロゲナーゼ活性アッセイ(実施例3に記載した通り)は、これらの形質転換細胞中に活性なグリセロールデヒドロゲナーゼが存在しないことを示した。実施例2に記載した通りにCre-生産プラスミドpJW168を用いて染色体からkanマーカーを除去し、株KLP23を得た。表現型kanSを有するいくつかの単離物はグリセロールデヒドロゲナーゼ活性を示さず、サザンプロット分析はkanマーカーの喪失を確認した。

【0160】

実施例5

グリセロール3-リン酸デヒドロゲナーゼ (DAR1) 及び／又はグリセロール

3-ホスファターゼ (GPP2) の発現のためのプラスミド構築及び株構築

グリセロール3-ホスファターゼ (GPP2) のための発現カセットの構築：

サッカロミセス・セレビシアエ染色体Vラムダクローン6592 (GenBank, 受け入れ番号U18813x11) をATCCから得た。5'末端にBamHI-RBS-XbaI部位及び3'末端にSmaI部位が導入された合成プライマー（配列番号：22及び配列番号：23）を用いる、標的DNAとしてのラムダクローンからのクローニングにより、グリセロール3-リン酸ホスファターゼ遺伝子 (GPP2) をクローニングした。産物をpCR-Script (Stratagene, Madison, WI) 中にSrfI部位においてサブクローニングし、GPP2を含有するプラスミドpAH15を形成した。プラスミドpAH15はpCR-Script SK+中のlacプロモーターからの発現に関して不活性な配向でGPP遺伝子を含有する。GPP2遺伝子を含有するpAH15からのBamHI-SmaIフラグメントをpBlueScript II SK+中に挿入し、プラスミドpAH19を形成した。pAH19はlacプロモーターからの発現に関して正しい配向でGPP2遺伝子を含有する。GPP2遺伝子を含有するpAH19からのXbaI-PstIフラグメントをpPHOX2中に挿入し、プラスミドpAH21を作った。pAH21/DH5 α は発現プラスミドである。

グリセロール3-リン酸デヒドロゲナーゼ (DAR1) のための発現カセットの構築：

合成プライマー（配列番号：24及び配列番号：25）を用いるゲノムS.セレビシアエDNAからのPCRクローニングにより、DAR1を単離した。成功したPCRクローニングは、DAR1の5'末端にNcoI部位を置き、NcoI中のATGがDAR1イニシエーターメチオニンである。DAR1の3'末端にBamHI部位が翻訳ターミネーターに続いて導入されている。PCRフラグメントをNcoI+BamHIを用いて消化し、発現プラスミドpTrc99A

(Pharmacia, Piscataway, NJ) 内の同じ部位中にクローニングし、pDAR1Aを得た。

【0161】

DAR1の5'末端により良いリボソーム結合部位を作るために、合成プライマー（配列番号：26と配列番号：27）のアニーリングにより得たSpeI-RBS-NcoIリンカーをpDAR1AのNcoI部位中に挿入し、pAH40を作った。プラスミドpAH40は、pTrc99A (Pharmacia, Piscataway, NJ) のtrcプロモーターからの発現に関して正しい配向で新しいRBS及びDAR1遺伝子を含有する。pDAR1AからのNcoI-BamHIフラグメント及び合成プライマー（配列番号：28と配列番号：29）のアニーリングにより得た第2の組のSpeI-RBS-NcoIリンカーをpBC-SK+ (Stratagene, Madison, WI) のSpeI-BamHI部位中に挿入し、プラスミドpAH42を作った。プラスミドpAH42はクロラムフェニコール耐性遺伝子を含有する。

dar1及びgpp2のための発現カセットの構築：

DAR1及びGPP2のための発現カセットを、標準的分子生物学的方法を用い、上記のそれぞれのDAR1及びGPP2サブクローンから組み立てた。リボソーム結合部位（RBS）及びGPP2遺伝子を含有するpAH19からのBamHI-PstIフラグメントをpAH40中に挿入し、pAH43を作った。RBS及びGPP2遺伝子を含有するpAH19からのBamHI-PstIフラグメントをpAH42中に挿入し、pAH45を作った。

【0162】

GPP2の5'末端におけるリボソーム結合部位を以下の通りに修正した。合成プライマーGATCCAGGAAACAGA（配列番号：30）をCTAGTCTGTTCTCTG（配列番号：31）と、GPP2遺伝子を含有するpAH19からのXbaI-PstIフラグメントにアニーリングすることにより得たBamHI-RBS-SpeIリンカーをpAH40のBamHI-PstI部位中に挿入し、pAH48を作った。プラスミドpAH48は、pTrc99A (Pharmacia, Piscataway, NJ) のtrcプロモーターか

らの発現に関して正しい配向でDAR1遺伝子、修正RBS及びGPP2遺伝子を含有する。

E. コリの形質転換：

本明細書に記載するプラスミドを、標準的な分子生物学的方法を用いてE. コリDH5 α 、FM5及びKLP23中に形質転換した。形質転換細胞をそれらのDNA RFLPパターンにより実証した。

【0163】

実施例6

クレブシエラ・ニューモニアエdhaレギュロンからの遺伝子を有するエシェリキア・コリの形質転換において用いるための発現プラスミドの構築

発現ベクターpTaciQの構築：

lacIq遺伝子 (Farabaugh, Nature 274 (5673), 765-769 (1978)) 及び tacプロモーター (Amann et al., Gene 25, 167-178 (1983)) をpBR322 (Sutcliffe, Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol. 43, 77-90 (1979)) の制限エンドヌクレアーゼ部位EcoRI中に挿入することにより、E. コリ発現ベクター pTaciQを調製した。多重クローニング部位 (a multiple cloning site) 及びターミネーター配列 (配列番号: 32) がEcoRIからSphIまでpBR322配列に取って代わる (replaces)。

グリセロールデヒドラターゼ遺伝子 (dhab1、2、3、X) のサブクローニング：

5'末端にEcoRI部位及び3'末端にXbaI部位が導入されたプライマー (配列番号: 33及び配列番号: 34) を用いるPCRにより、dhab3遺伝子のための読み取り枠をpHK28-26から増幅した。産物をpLitmus29 (New England Biolab, Inc., Beverly, MA) 中にサブクローニングし、dhab3を含有するプラスミドpDHAB3を形成した。

【0164】

pHK28-26からのdh a Bオペロンのdh a B1、dh a B2、dh a B3及びdh a BXに関する全コード領域を含有する領域を、制限酵素KpnI及びEcoRIを用いてpBlue-script I I KS+ (Stratagene, La Jolla, CA) 中にクローニングし、プラスミドpM7を作った。

【0165】

ApalI及びXbaIを用いるプラスミドpM7の消化によりdh a BX遺伝子を除去し、5. 9 kbフラグメントを精製し、それをプラスミドpDHAB3からの325-bpのApalI-XbaIフラグメントと連結し、dh a B1、dh a B2及びdh a B3を含有するpM11を作った。

【0166】

5'末端にHindIII部位及び共通リボソーム結合部位及び3'末端にXbaI部位が導入されたプライマー（配列番号：35及び配列番号：36）を用いるPCRにより、dh a B1遺伝子のための読み取り枠をpHK28-26から増幅した。産物をpLittmus28 (New England Biolab, Inc., Beverly, MA) 中にサブクローニングし、dh a B1を含有するプラスミドpDT1を形成した。

【0167】

dh a B1遺伝子、dh a B2遺伝子及びdh a B3遺伝子の一部を含有するpM11からのNotI-XbaIフラグメントをpDT1中に挿入し、dh a B発現プラスミド、pDT2を作った。pDT2からのdh a B (1, 2, 3) 遺伝子を含有するHindIII-XbaIフラグメントをpTaciQ中に挿入し、pDT3を作った。

1, 3-プロパンジオールデヒドロゲナーゼ遺伝子 (dh a T) のサブクローニング：

1, 3-プロパンジオールデヒドロゲナーゼ (dh a T) 遺伝子を含有するpHK28-26のKpnI-SacIフラグメントをpBlue-script I I KS+中にサブクローニングし、プラスミドpAH1を作った。鑄型DNAとしてのpAH1ならびに5'末端にXbaI部位及び3'末端にBamHI部

位が導入された合成プライマー（配列番号：37と配列番号：38）からのPCRにより、dhaT遺伝子を増幅した。産物をpCR-Script (Stratagene)中にSrfI部位においてサブクローニングし、dhaTを含有するプラスミドpAH4及びpAH5を形成した。プラスミドpAH4はpCR-Script中のlacプロモーターからの発現に関して正しい配向でdhaT遺伝子を含有し、pAH5は反対の配向でdhaT遺伝子を含有する。dhaT遺伝子を含有するpAH4からのXbaI-BamHIフラグメントをpTaciQ中に挿入し、プラスミドpAH8を形成した。RBS及びdhaT遺伝子を含有するpAH8からの HindIII-BamHIフラグメントをpBlue-scriptIKS+中に挿入し、pAH11を作った。

dhaT及びdhaB (1, 2, 3) のための発現カセットの構築：

標準的な分子生物学的方法を用い、dhaT及びdhaB (1, 2, 3) のための発現カセットを前記のそれぞれのdhaB (1, 2, 3) 及びdhaTサブクローンから組み立てた。pDT3からのdhaB (1, 2, 3) 遺伝子を含有するSpeI-SacIフラグメントをpAH11中にSpeI-SacI部位において挿入し、pAH24を作った。制限酵素SalI-XbaIで消化されたpAH5中にSalI-XbaIリンカー（配列番号：39及び配列番号：40）を挿入し、pDT16を作った。リンカーはXbaI部位を破壊する。次いでpDT16からの1kbのSalI-MluIフラグメントをpAH24中に挿入し、現存するSalI-MluIフラグメントに取って代わらせ、pDT18を作った。pDT18からのSalI-NotIフラグメント及びpM7からのNotI-XbaIフラグメントをpCL1920（配列番号：41）中に挿入することにより、pDT21を構築した。ストレプトミセスからのグルコースイソメラーゼプロモーター配列（配列番号：42）をPCRによりクローニングし、pLitmus28のEcoRI-HindIII部位中に挿入し、pDT5を構築した。pDT5のEcoRI-PvuIIフラグメントをpCL1920のEcoRI-PvuI部位中に挿入することにより、pCL1925を構築した。pDT21のHindIII-MluIフラグメント及びpDT21のMluI-XbaIフラグメントをpCL1925のHindIII-XbaI

部位中にクローニングすることにより、pDT24を構築した。

dhaT及びdhaB (1、2、3、X) のための発現カセットの構築：

pDT18からのSacI-NotIフラグメント及びpM7からのNotI-XbaIフラグメントをpCL1920（配列番号：41）中に挿入することにより、pDT21を構築した。ストレプトミセスからのグルコースイソメラーゼプロモーター配列（配列番号：42）をPCRによりクローニングし、pLitmus28のEcoRI-HindIII部位中に挿入し、pDT5を構築した。pDT5のEcoRI-PvuIIフラグメントをpCL1920のEcoRI-PvuII部位中に挿入することにより、pCL1925を構築した。pDT21のHindIII-MluIフラグメント及びpDT21のMluI-XbaIフラグメントをpCL1925のHindIII-XbaI部位中にクローニングすることにより、pDT24を構築した。

dhaR、orfY、dhaT、orfX、orfW及びdhaB (1、2、3、X) のための発現カセットの構築：

pHK28-26のSacI-EcoRIフラグメントをpCL1925のSacI-EcoRI部位中に挿入することにより、pDT29を構築した。

dhaR、orfY、orfX、orfW及びdhaB (1、2、3、X) のための発現カセットの構築：

PCR-媒介オーバーラップエクステンションとして既知の方法により、遺伝子dhaTの最初の5つ及び最後の5つのコドン（及び停止コドン）を除くすべてが欠失しているプラスミドpDT29の誘導体を構築した。pDT29を鋳型として用い、以下のプライマーを用いて2つの一次PCR産物を形成した：

配列番号：43=5' GAC GCA ACA GTA TTC CGT CG C3'；

配列番号：44=5' ATG AGC TAT CGT ATG TTC CG C CAG GCA TTC TGA GTG TTA ACG 3'；

配列番号：45=5' GCC TGG CGG AAC ATA CGA TA G CTC ATA ATA TAC 3'；

配列番号：46=5' CGG GGC GCT GGG CCA GTA CT

G 3'。

【0168】

配列番号：45を配列番号：46と対にし、931bps且つ5' dhaB1 (ユニークScal部位まで)、orfYのすべて及びdhaTの最初の5つのコドンを含む核酸を包含する産物を形成した。配列番号：43を配列番号：44と対にし、1348bps且つdhaTの最後の5つのコドン (及び停止コドン)、orfXのすべて、orfWのすべて及び5' dhaR (ユニークSapI部位まで)を含む核酸を包含する産物を形成した。配列番号：44の5'末端における15の塩基は配列番号：45の15塩基部分の逆相補配列である尾部を構成する。同様に、配列番号：45の5'末端における11の塩基は、配列番号：44の11塩基部分の逆相補配列である尾部を構成する。かくして2つの一次PCR産物をアニーリング (26bp尾部オーバーラップを介する) 及びPCRによる伸長 (extending) の後に一緒にし、2253bpsの第3の核酸産物を形成した。この第3のPCR産物をSapI及びScalを用いて消化し、やはりSapI及びScalを用いて消化されたpDT29中に連結し、プラスミドpKP32を形成し、それはdhaT内における大きな読み取り枠内欠失 (in-frame deletion) を除いてpDT29と同じである。

【0169】

実施例7

E. コリ株KLP23/pAH48/pDT29を用いるグルコースの
1, 3-プロパンジオールへの転換及び

KLP23/pAH48/pKP32を用いる改良法

予備一培養：

KLP23/pAH48/pDT29及びKLP23/pAH48/pKP32を発酵槽への播種のために、200mg/Lのカルベニシリン (もしくはアンピシリン) 及び50mg/Lのスペクチノマイシンを含有する2YT培地 (10g/L 酵母抽出物、16g/L トリプトン及び10g/L NaCl) 中で予備一培養した。KLP23/pAH48/pKP32は、dhaTが欠失していることを除いてKLP23/pAH48/pDT29と同じである。

【0170】

2-LのErlenmeyer フラスコにおいて500mLの培地中で、凍結材料 (frozen stocks) (凍結保護剤として10%DMSO) から培養を開始し、250 rpmにおける震盪機中で35°Cにおいて、約1.0AUのOD₅₅₀に達するまで成長させ、発酵槽への播種に用いた。

発酵培地：

以下の成分を発酵槽中で一緒に滅菌した：4.5g KH₂PO₄、1.2g クエン酸、1.2g MgSO₄ · 7H₂O、3.0g 酵母抽出物、2.0g クエン酸第2鉄アンモニウム、消泡剤としての5mL Mazu DF204、1.2g CaCl₂ · 2H₂O及び7.3mL 硫酸。20~28%のNH₄OHを用いてpHを6.8に上げ、以下の成分を加えた：1.2g カルベニシリソムもしくはアンピシリソム、0.30g スペクチノマイシン、60mLの微量栄養素の溶液及びグルコース (60~67重量%供給材料から)。接種の後、容積は6.0Lであり、グルコース濃度は10g/Lであった。微量栄養素の溶液は (g/L) : クエン酸 · H₂O (4.0)、MnSO₄ · H₂O (3.0)、NaCl (1.0)、FeSO₄ · 7H₂O (0.10)、CoCl₂ · 6H₂O (0.10)、ZnSO₄ · 7H₂O (0.10)、CuSO₄ · 5H₂O (0.010)、H₃BO₃ (0.010) 及びNa₂MoO₄ · 2H₂O (0.010) を含有した。

発酵成長：

上記の培地を用いて15Lの攪拌されたタンク発酵槽を調製した。温度を35°Cで制御し、アンモニア水 (20~28重量%) を用いてpHを6.8に調節した。空気流量 (1分当たりに6~12標準リットルの最小値に設定) 及び攪拌機速度 (350~690 rpmの最小値に設定) に関する初期値は、OUR値が約140ミリモル/L/hに達したら溶解酸素 (DO) 制御が開始されるように設定された。背圧は0.5バールで制御された。DO制御は10%に設定された。小さな逸脱を除き、グルコースは60%もしくは67% (重量) 供給材料を用いて0g/L~10g/Lにおいて保持された。下記に記す通りにビタミンB₁₂又は補酵素B₁₂を加えた。

KLP23/pAH48/pDT29を用いる発酵：

E. コリ株KLP23/pAH48/pDT29を用いるグルコースの1, 3-プロパンジオール(1, 3-PD)への転換の代表的な発酵の概略を表4に示す。ビタミンB₁₂(0. 075 g/L、500 mL)を、接種から3時間後に開始して16 mL/hの速度で供給した。1, 3-プロパンジオールの収率は24重量% (消費されたグルコースのg当たりの1, 3-プロパンジオールのg)であり、68 g/Lの1, 3-プロパンジオールの力価が得られた。

【0171】

【表5】

表4

E.コリ株KLP23/pAH48/pDT29を用いるグルコースの1,3-プロパンジオール(1,3-PD)への転換の代表的な発酵の概略

時間(h)	OD550 (AU)	DO (%)	グルコース(g/L)	グリセロール(g/L)	1,3-PD (g/L)
0	0	150	12.9	0.0	0
6	17	80	8.3	3.1	1
12	42	53	2.8	12.5	9
18	98	9	5.7	12.6	32
24	136	11	32.8	12.0	51
30	148	10	12.3	13.3	62
32	152	11	12.5	14.3	65
38	159	11	1.5	17.2	68

【0172】

同じビタミンB₁₂供給材料を用い、発酵の時間経過を横切る (across) ビタミンB₁₂の2倍濃度の添加又はボーラス添加において類似の結果が得られた。得られた最高の力価は77 g/Lであった。

KLP23/pAH48/pKP32を用いる改良された発酵:

E. コリ株KLP23/pAH48/pKP32を用いるグルコースの1, 3-プロパンジオール(1, 3-PD)への転換の代表的な発酵の概略を表5に示す。ビタミンB₁₂(0. 150 g/L、500 mL)を、接種から3時間後に開始して16 mL/hの速度で供給した。36 h後、2 Lの発酵ブイヨンをページし、グルコース供給材料の連続的添加を可能にした。1, 3-プロパンジオールの収率は26重量% (消費されたグルコースのg当たりの1, 3-プロパンジオ

ールのg)であり、112g/Lの1,3-プロパンジオールの力価が得られた。

【0173】

【表6】

表5

E.コリ株KLP23/pAH48/pKP32を用いるグルコースの1,3-プロパンジオール(1,3-PD)への改良された転換の代表的な発酵の概略

時間(h)	OD550 (AU)	DO (%)	グルコース(g/L)	グリセロール(g/L)	1,3-PD (g/L)
0	0	148	12.8	0.0	0
6	22	84	6.9	3.3	0
12	34	90	9.7	10.4	7
18	66	43	9.3	5.9	24
24	161	9	0.2	2.5	46
30	200	10	0.2	6.0	67
36	212	10	1.2	9.7	88
42	202	2	0.1	15.5	98
48	197	12	1.2	23.8	112

【0174】

同じビタミンB₁₂供給材料を用い、発酵の時間経過を横切るビタミンB₁₂の半分の濃度の添加又はボーラス添加において類似の結果が得られた。得られた最高の力価は114g/Lであった。

【0175】

実施例8

グルコースからの1,3-プロパンジオールの高められた収率のための

E.コリKLP23のトリオースリン酸イソメラーゼ突然変異体の操作

E.コリKLP23におけるトリオースリン酸イソメラーゼ遺伝子置換のための

プラスミドの構築:

Puregene DNA Isolation Kit (Gentra Systems, Minneapolis, MN)を用いてE.コリKLP23ゲノムDNAを調製した。cdh及びトリオースリン酸イソメラーゼ(tpiA)遺伝子の3'末端を含有する1.0kbのDNAフラグメントを、プライマー配

列番号：47及び配列番号：48を用いてKLP23ゲノムDNAからPCR（*Mullis and Faloon, Methods Enzymol.* 155, 335-350 (1987)）により増幅した。tpiAの5'末端、y_iiQ及びy_iiR遺伝子の5'末端を含有する1.0kbのDNAフラグメントを、プライマー配列番号：49及び配列番号：50を用い、KLP23ゲノムDNAからPCRにより増幅した。プライマー配列番号：49中にはScaI部位が導入された。プライマー配列番号：49の5'末端はプライマー配列番号：48の逆相補配列であり、続くオーバーラップエクステンションPCRを可能にした。オーバーラップエクステンション法（*Horton et al.*, *Bio Techniques* 8, 528-535 (1990)）による遺伝子切除を用い、鑄型として上記の2つのPCRフラグメント及びプライマー配列番号：47及び配列番号：50を用いるPCRにより2.0kbのフラグメントを形成した。このフラグメントは、768bpのtpiA構造遺伝子の73%の欠失を示した。全体としてこのフラグメントは（部分的tpiA内の）ScaIクローニング部位の両側上に1.0kbのフランкиング領域を有し、相同的組換えによる染色体遺伝子置換を可能にした。

【0176】

上記の平滑末端化された2.0kbのPCRフラグメントを、Zero Blunt PCR Cloning Kit (Invitrogen, San Diego, CA) を用いてpCR-Bluntベクター中にクローニングし、カナマイシン及びゼオシン耐性遺伝子を含有する5.5kbのプラスミドpRN106-2を得た。バクテリオファージP1-loxP部位 (*Snaith et al.*, *Gene* 166, 173-174 (1995)) によりフランкиングされたクロラムフェニコールー耐性遺伝子を含有するpLoxCat1 (未公開の結果) からの1.2kbのHincIIフラグメントを用い、プラスミドpRN106-2中のtpiAフラグメントを、それをScaI-消化プラスミドpRN106-2に連結することにより分断し、6.8kbのプラスミドpRN107-1を得た。

線状DNA形質転換によるトリオースリン酸イソメラーゼ突然変異体RJ8mの

操作：

鋳型としてpRN107-1ならびにプライマー配列番号：47及び配列番号：50を用い、tpiAフランкиング領域及びloxP-CmR-loxPカセットを含有する3.2kbフラグメントをPCR増幅し、ゲルー抽出した。最高で1μgのこの3.2kbの線状DNAフラグメントを用いてE.コリKLP23を電気形質転換し、クロラムフェニコール耐性(12.5μg/mL)且つカナマイシン感受性(30μg/mL)である形質転換細胞をM9最少培地上で、1mMグルコース上における劣ったグルコース使用に関して、1mMグルコネート上における正常なグルコネート使用に関して、および1mMグルセロール上における宿主KLP23のグリセロール非-使用表現型を確かめるためにさらにスクリーニングした。1つのそのような突然変異体、RJ8mからのゲノムDNAのEcoRI消化は、無損傷のtpiA遺伝子を用い、サザン分析(Southern, J. Mol. Biol. 98, 503-517 (1975))を介して精査すると、それが二重一交差組込み体(tpiA遺伝子置換)であることを示し、それはクロラムフェニコール耐性遺伝子内における追加のEcoRI部位の存在のおかげで2つの予測される6.6kb及び3.0kbバンドが観察されるからであった。予測通り、宿主KLP23及び野生一型FM5対照標準は、それぞれ単独の8.9kb及び9.4kbバンドを与えた。このtpiA突然変異体をプライマー配列番号：51及び配列番号：52を用いるゲノムPCRによりさらに分析し、それは予測される4.6kbのPCRフラグメントを与えたが、同じプライマー対に関し、宿主KLP23及び野生一型FM5株は両方とも予測される3.9kbのPCRフラグメントを与えた。tpiA突然変異体RJ8m及び宿主KLP23からの無一細胞抽出物を、基質としてグリセルアルデヒド3-リン酸を用いてtpiA活性に関して調べると、RJ8mの場合には活性が観察されなかった。プラスミドpAH48を用いてtpiA突然変異体RJ8mを電気形質転換し、グルコースからのグリセロール生産を可能にし、又、プラスミドpAH48とpDT29もしくはpKP32の両方を用いて電気形質転換し、グルコースからの1,3-プロパンジオール生産を可能にした。RJ8mからクロラムフェニコール耐性マーカーを除去してRJ8を得た。

【0177】

実施例9

E. コリ株R J 8 / p A H 4 8 / p D T 2 9 を用いる
グルコースの 1, 3-プロパンジオールへの転換及び
R J 8 / p A H 4 8 / p K P 3 2 を用いる改良法

予備一培養:

実施例7に記載した通り、R J 8 / p A H 4 8 / p D T 2 9 及びR J 8 / p A H 4 8 / p K P 3 2 を発酵槽への播種のために予備一培養した。R J 8 / p A H 4 8 / p K P 3 2 は、d h a T が欠失していることを除いてR J 8 / p A H 4 8 / p D T 2 9 と同じである。

発酵槽培地:

発酵槽培地は実施例7に記載した通りであった。

発酵成長:

発酵槽成長は、空気流量（分当たりに5～6標準リットルの最小値に設定）及び攪拌機速度（300～690 rpmの最小値に設定）に関する初期値を、O U R 値が60～100ミリモル/L/hに達したら溶解酸素（DO）制御が開始されるように設定したことを除いて、実施例7に記載した通りであった。下記に記す通りにビタミンB₁₂ 又は補酵素B₁₂ を加えた。

R J 8 / p A H 4 8 / p D T 2 9 を用いる発酵:

E. コリ株R J 8 / p A H 4 8 / p D T 2 9 を用いるグルコースの 1, 3-プロパンジオール (1, 3-PD)への転換の代表的な発酵の概略を表6に示す。ビタミンB₁₂ は、2、8及び26hにそれぞれ2、16及び16mgのボーラス添加として与えた。1, 3-プロパンジオールの収率は35重量% (消費されたグルコースのg当たりの1, 3-プロパンジオールのg) であり、50. 1g/Lの1, 3-プロパンジオールの力価が得られた。

【0178】

【表7】

表6

E.コリ株RJ8/pAH48/pDT29を用いるグルコースの1,3-プロパンジオール(1,3-PD)への転換の代表的な発酵の概略

時間(h)	OD550 (AU)	DO (%)	グルコース (g/L)	グリセロール (g/L)	1,3-PD (g/L)
0	0	140	10.6	0.1	0.0
6	5	107	11.1	0.5	0.4
10	16	90	8.5	1.7	1.3
14	25	86	1.8	2.4	5.9
19	38	53	3.5	5.9	15.4
25	53	38	0.1	9.2	26.7
31	54	10	4.5	7.4	39.0
37	37	23	17.2	6.0	45.0
43	21	13	9.9	7.7	50.1

【0179】

RJ8/pAH48/pKP32を用いる改良された発酵：

E.コリ株RJ8/pAH48/pKP32を用いるグルコースの1,3-プロパンジオール(1,3-PD)への転換の代表的な発酵の概略を表7に示す。ビタミンB₁₂は、約26及び44時間にそれぞれ48及び16mgのボーラス添加として与えた。1,3-プロパンジオールの収率は34重量%（消費されたグルコースのg当たりの1,3-プロパンジオールのg）であり、129g/Lの1,3-プロパンジオールの力価が得られた。

【0180】

【表8】

表7

E.コリ株RJ8/pAH48/pKP32を用いるグルコースの1,3-プロパンジオール(1,3-PD)への改良された転換の代表的な発酵の概略

時間(h)	OD550 (AU)	DO (%)	グルコース(g/L)	グリセロール(g/L)	1,3-PD (g/L)
0	0	150	12.6	0.1	0
6	12	113	6.0	2.6	0
12	24	99	0.0	10.6	0
18	51	76	2.4	28.9	0
24	78	82	2.4	44.2	5
30	114	70	3.8	26.9	33
36	111	72	0.0	20.0	57
42	139	65	0.1	21.9	69
48	157	36	0.1	22.4	79
55	158	25	0.2	21.4	94
64	169	14	0.1	15.8	113
72	169	12	0.1	13.4	119
74	162	14	0.1	14.8	129

【0181】

実施例 10

改良された1, 3-プロパンジオールプロセスにおける

E. コリ非-特異的触媒活性 (y g h D) の同定

改良された触媒を用いる1, 3-プロパンジオール-生産発酵における非-特異的触媒活性の立証:

1, 3-プロパンジオールデヒドロゲナーゼ活性に関する全細胞アッセイを用い、発酵条件下で、ビタミンB₁₂の添加及び3-ヒドロキシプロピオナルデヒド(3-HPA)の生産の後に非-特異的触媒活性がE. コリ中に存在するが、前には存在しないことを示した。グリセロール-生産及び1, 3-プロパンジオール-生産プラスミド、それぞれpAH48及びpKP32を含有する組換えE. コリ株を10Lの発酵槽において、本質的に実施例7に記載した通りに、しかしビタミンB₁₂の不在下で成長させた。タンクが約100のOD₅₅₀に達したらビタミンB₁₂ボーラス(48mg)を加えた。ビタミンB₁₂の添加の直前及び2h後に細胞のアリコートをタンクから採取した。遠心により細胞を回収し、新し

いタンパク質合成を妨げるために $150 \mu\text{g}/\text{mL}$ のクロラムフェニコールを含有する P B S 緩衝液中にそれらの最初の容積まで再懸濁させた。最終的容積が、約 10 の O D₅₅₀ において 50 mL となるのに適した容積のクロラムフェニコール処理細胞を、反応混合物 ($10 \text{ g}/\text{L}$ グルコース、 $10 \text{ g}/\text{L}$ グリセロール、 $1 \text{ mg}/\text{L}$ 補酵素 B₁₂ 及び $150 \mu\text{g}/\text{mL}$ クロラムフェニコールを含有する P B S 緩衝液) を含有する 250 mL のバフルドフラスコ (b a f f l e d f l a s k s) に加えた。光から保護されたフラスコを 35°C で 250 rpm において震盪させた。時間の経過に及んで H P L C 分析のためのアリコートを採取した。ビタミン B₁₂ 添加の前もしくは後に発酵槽から回収された細胞を含有するフラスコ中で、3-H P A の時間一依存的生産が観察された。まさに対照的に、ビタミン B₁₂ 添加の後に発酵槽から回収された細胞を含有するフラスコのみにおいて、有意なレベルの 1, 3-プロパンジオールが観察された。

無一細胞抽出物中における非一特異的触媒活性の検出：

未変性ゲル活性染色アッセイ (n a t i v e g e l a c t i v i t y s t a i n a s s a y) を用い、無一細胞抽出物中における非一特異的触媒活性を示した。ビタミン B₁₂ の添加の前及び後に、グリセロールー生産及び 1, 3-プロパンジオールー生産プラスミド、それぞれ p A H 4 8 及び p K P 3 2 を含有する組換え E. コリ株を用いる代表的な 10-L 発酵から細胞を回収し；フレンチプレスを用いる細胞破壊により無一細胞抽出物を調製した。無一細胞抽出物、純粋なクレブシエラ・ニューモニアエ 1, 3-プロパンジオールデヒドロゲナーゼ (d h a T) の試料及び分子量標準を未変性勾配ポリアクリルアミドゲルに適用し、その上で移動させた (r u n o u t)。次いでゲルを基質 1, 3-プロパンジオールと NAD⁺ 又はエタノールと NAD⁺ に暴露した。予想通り、1, 3-プロパンジオールが基質であるゲルにおいては、D h a T に関する活性染色が観察され、それは未変性ゲル上を約 340 K d a 1 において移動した。この活性は純粋なクレブシエラ・ニューモニアエ 1, 3-プロパンジオールデヒドロゲナーゼが適用されたレーンのみで観察された。対照的に、1, 3-プロパンジオールが基質であり、ビタミン B₁₂ - 後無細胞抽出物が適用された場合、約 90 K d a 1 において非一特異的触媒活性が観察された。基質としてエタノールが用いら

れると、D h a T バンドも非一特異的触媒活性バンドも見えず、ビタミンB₁₂ 添加の前及び後に約120Kda1において別のバンドが見いだされた。この新しいバンドは、典型的にはすべての生物において見いだされる、基質としてエタノールに対して特異性を有するアルコールデヒドロゲナーゼを示すのが最もありそうなことである。

【0182】

タンパク質が酵素アッセイ段階の前に分子量によって分離されるこの未変性ゲルアッセイは、活性が低く、E. コリに関して十分に特性化され且つすべての生物で見いだされる、基質としてエタノールに対して特異性を有するアルコールデヒドロゲナーゼと活性が異なっているらしい構築物における1, 3-プロパンジオールの還元の測定で、より高い感度及び精度を与える。デヒドロゲナーゼアッセイは、デヒドロゲナーゼが1, 3-プロパンジオール（又は他のアルコール）からNAD⁺への電子の伝達を触媒するという原理で働く。次いでPMS（フェナジンメトサルフェート）がNADHとゲル中で沈殿を形成するテトラゾリウムブロミド色素（MTT、3-[4, 5-ジメチルチアゾール-2-イル]-2, 5-ジフェニルテトラゾリウムブロミド）の間の電子伝達をカップリングさせる。基質中に数時間から終夜浸した後、ゲルを洗浄して試薬及び可溶性の色素を除去する。ゲル上の活性デヒドロゲナーゼがあるバンドにおいて、不溶性の青い色素が生成する。アッセイの種々の側面がJohnson and Lin (J. Bacteriol. 169: 2050 (1987)) により記載されている。

E. コリにおける非一特異的触媒活性の精製及び同定：

実施例7のKLP23/pAH48/pKP32を用いる改良法で記載した典型的な1, 3-プロパンジオール生産実験の最後から収穫した細胞につき、非一特異的触媒活性の大規模な部分的精製を行った。細胞ペレット（16g）を洗浄し、20mL 50mM Heps緩衝液、pH 7.5中に3回再懸濁させた。音波処理により懸濁液中の細胞をライシスさせた。遠心（15分、20, 000×g、10°C）により無一細胞抽出物を得、氷上で攪拌しながら250mgのプロタミンサルフェートを加えることにより、上澄み液をさらに透明にした。遠心（20分、20, 000×g、10°C）によって得た上澄み液を、Heps

緩衝液を用いて平衡化された Superdex^R 200 分取等級カラム (6 x 60 cm) に通過させることにより分別した。10 mL づつの画分を集め、それぞれのアリコートを 10, 000 MW カットオフ Centricon^R 膜を用いて 25 分の 1 に濃縮してから、未変性ゲル活性染色によりアッセイした。画分 107-112 において非一特異的触媒活性が同定され、画分 108-109 においてピーク活性が同定された。画分 108 及び 109 のもっと大きなアリコート (7 mL づつ) を 50 分の 1 に濃縮し、12-レーンの未変性ゲルのすべてのレーン上に負荷した。ゲルを半分に切り、半分をデヒドロゲナーゼ活性に関して染色し、そこには暗青色のバンドが現れ、それは非一特異的触媒活性を示した。未染色のゲルを上から下に染色ゲルと並べ、非一特異的触媒活性のバンドに対応するバンドを未染色ゲル上で切った。ゲルのストリップを粉碎し、粉碎された粒子を 0.5 mL の 2D-負荷緩衝液中に沈め、95°C に 5 分間加熱し、遠心してゲル粒子を除去することにより、可溶性タンパク質を抽出した。Swiss 2D データベース (<http://www.expasy.ch/ch2d/>; Tonella et al. Electrophoresis 19: 1960-1971 (1998)) において E. コリ抽出物の 2D-PAGE のために記載されている条件を用い、2-次元ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (2D-PAGE) のために、上澄み液を等電点電気泳動 (IEF) ストリップ上に負荷した。エレクトロプロッティングによりゲルを PVDF 膜に移した。コロイドブルー (Colloidal blue) ゲル染色を用いて膜をタンパク質に関して染色した。非一特異的触媒活性を同定するために用いられた染色されたプロットを図 6 に示す。アミノ末端ペプチド配列決定のための標準的方法を用いてスポットを同定した。1 つのスポット (スポット A) のみがオキシドレダクターゼ活性をコードした。スポット A (図 6) の 19 サイクルは、FASTA 探索機 (search tool) により、推定オキシドレダクターゼ活性を有する E. コリの読み取り枠である yqhD のアミノ末端と 100% の同一性適合 (identity match) を与えた。yqhD によりコードされるタンパク質に関する完全アミノ酸配列を配列番号: 57 に示し; 対応する DNA 配列を配列番号: 58 に示す。yqhD 遺伝子は、おそらく NADH- 依存性 プタノールデヒドロゲナ

一ゼ2であるクロスツリジウム中の遺伝子a d h Bに40%の同一性を有する。

E. コリKLP23中のy q h Dの遺伝子破壊：

生化学的アッセイ及びアミノ末端アミノ酸配列決定は、非一特異的触媒活性がE. コリy q h D遺伝子によりコードされるかも知れないことを示唆した。未知の機能のこの遺伝子は仮定的オキシドレダクターゼをコードし、d h a T遺伝子によりコードされるシトロバクテル・フレウンジイ及びクレブシェラ・ニューモニアエ1, 3-プロパンジオールデヒドロゲナーゼ中にも見いだされる2つのアルコールデヒドロゲナーゼの特徴(s i g n a t u r e)を含有する。

【0183】

この遺伝子を破壊するために、y q h Dならびに830bpの5' - フランкиングDNA配列及び906bpの3' - フランкиングDNA配列をE. コリKLP23(実施例4)ゲノムDNAから、Taqポリメラーゼ及び以下のプライマーを用いるPCRにおいて増幅した：

(配列番号：59) 5' - G C G G T A C C G T T G C T C G A C G C T C A G G T T T T C G G - 3'

(配列番号：60) 5' - G C G A G C T C G A C G C T T G C C C T G A T C G A G T T T T G C - 3'

反応を94°Cで1分間、50°Cで1分間及び72°Cで3分間、35サイクルを行い、続いて72°Cで5分間、最終的伸長を行った。得られる3.7KbのDNAフラグメントを精製し、SacI及びKpnIで消化し、同様に消化されたpBluescriptIIKS(+) (Strategene)に16°Cで16h連結した。連結されたDNAを用いてE. コリDH5α(Gibco/BRL)を形質転換し、X-gal (40μg/mL)及びアンピシリン (100μg/mL)を含有するLB寒天(Difco)上で白いコロニー色を示す形質転換細胞から期待されるプラスミド、pJSP29を単離した。プラスミドpJSP29をAfaII及びNdeIで消化し、363bpのy q h D遺伝子及び46bpの3' - フランкиングDNA配列を含む409bpのDNAフラグメントを遊離させた。残る5, 350bpのDNAフラグメントを精製し、pLoxKan2 (Genencor International, Palo Alto,

CA) からのカナマイシン耐性遺伝子を含有する 1, 374 bp の Af111 / NdeI DNA フラグメントに 16°C で 16 h 連結した。連結された DNA を用いて E. コリ DH5 α を形質転換し、カナマイシン (50 μ g/mL) を含有する LB 寒天培地上で選択された形質転換細胞から期待されるプラスミド、pJSP32-Blue を単離した。プラスミド pJSP32-Blue を KpnI 及び SacI で消化し、3, 865 bp の yqhD 破壊カセットを精製し、同様に消化された pGP704 (Miller and Mekalanos, J. Bacteriol. 170: 2575-2583 (1988)) に 16°C で 16 h 連結した。連結された DNA を用いて E. コリ SY327 (Miller and Mekalanos, J. Bacteriol. 170: 2575-2583 (1988)) を形質転換し、カナマイシン (50 μ g/mL) を含有する LB 寒天培地上で選択された形質転換細胞から期待されるプラスミド、pJSP32 を単離した。プラスミド pJSP32 を E. コリ KLP23 中に形質転換し、形質転換細胞をカナマイシン (50 μ g/mL) を含有する LB 寒天上で選択した。スクリーニングされた 200 のカナマイシナー耐性形質転換細胞の中で、2 つが、yqhD 破壊カセットによる yqhD 遺伝子の置換を生ずる二重一交差組換え結果の場合に予測されるアンピシリンー感受性表現型を示した。

【0184】

これらの 2 つの形質転換細胞から単離されるゲノム DNA を鋳型として用い、ならびに以下の組のプライマー対を用いて、PCR により yqhD 遺伝子の破壊を確認した：

1 組：

(配列番号：61) 5' - GCGAGCTCGACGCTTGCCCTGATC
GAGTTTTGC - 3'

(配列番号：62) 5' - CAGCTGGCAATTCCGGTTCG - 3'

2 組：

(配列番号：63) 5' - CCCAGCTGGCAATTCCGGTTCGCT
TGCTGT - 3'

(配列番号：64) 5' - GGCGACCCGACGCTCCAGACGGAA

G C T G G T - 3'

3組：

(配列番号：65) 5' - C C G C A A G A T T C A C G G A T G C A T C G T
G A A G G G - 3'(配列番号：66) 5' - C G C C T T C T T G A C G A G T T C T G A G C G
G G A - 3'

4組：

(配列番号：67) 5' - G G A A T T C A T G A A C A A C T T T A A T C T
G C A C A C - 3'(配列番号：68) 5' - G T T T G A G G C G T A A A A A G C T T A G C G
G G C G G C - 3'

反応はExpand High Fidelity Polymerase (Boehringer Manheim) 又はTaqポリメラーゼを含有するPlatinum PCR Supermix (Gibco/BRL) を用いて、94°Cで1分間、50°Cで1分間及び72°Cで2分間、35サイクルを行い、続いて72°Cで5分間最終的伸長を行った。得られるPCR産物を1.0% (w/v) アガロース中におけるゲル電気泳動により分析した。表8にまとめる結果は、両方の形質転換細胞におけるyqhD遺伝子の破壊を確認した。

【0185】

【表9】

表8

プライマーの組	予測されるサイズ(bp)		観察されるサイズ(bp)
	yqhD破壊	yqhD野生型	
1	1,200	産物なし	~1,200
2	1,266	産物なし	~1,266
3	2,594	産物なし	~2,594
4	産物なし	1,189	~900

【0186】

*y q h D*破壊は、46bpの3' - フランキング遺伝子間DNA配列を含む*y q h D*の3'末端を欠失させる。欠失は121アミノ酸に対応する363bpの3' *y q h D*コード配列を除去する。停止コドンは、カナマイシン耐性カセット中の残りの*y q h D*コード配列の15bp下流に存在する。

【0187】

プラスミドpAH48及びpKP32をE.コリKLP23 (*y q h D*)中に共一形質転換し、両方のプラスミドを含有する形質転換細胞をアンピシリン (100 μg/mL) 及びスペクチノマイシン (50 μg/mL) を含有するLB寒天上で選択した。代表的な形質転換細胞を、ビタミンB₁₂の存在下もしくは不在下での10Lの発酵においてグルコースを1, 3-プロパンジオールに転換するその能力に関して調べた。

E.コリ株KLP23/pAH48/pKP32における有意な1, 3-プロパンジオール生産に*y q h D*が必要であることの立証:

1, 3-プロパンジオール生産への*y q h D*破壊の影響に関して調べるために、E.コリ株KLP23 (*y q h D*) / pAH48 / pKP32を用い、本質的に実施例7に記載した通りに1, 3-プロパンジオールの生産のための発酵を行った。

【0188】

非一特異的触媒活性のノックアウト、E.コリ株KLP23 (*y q h D*) / pAH48 / pKP32を用いる代表的10-L発酵を表9に示す。OD₅₅₀が30Aを越えた時に (10. 4h) ビタミンB₁₂を添加するまで、生物は安定して細胞塊及びグリセロールを堆積させた。ビタミンB₁₂を10. 4hに8mgのボーラス添加として与え、その後ビタミンB₁₂を1. 32mL/hの速度で連続的に供給した。B₁₂の添加に続く4h以内に、グルコース消費が遅くなり、酸素使用速度が低下し、光学濃度におけるさらなる向上はなかった。グルコースの発酵が止まり、タンク中のグルコース濃度が蓄積した。得られた1, 3-プロパンジオールの最高の力価は0. 41g/Lであった。アンピシリン及びスペクチノマイシンを含有する寒天平板上で細胞の希釀系列を平板培養することにより、生物をその生存率に関して調べた。平板を30℃のインキュベーター中で24hイ

ンキュベーションした。E. コリ KLP23 (yqhD⁻) / pAH48 / pKP32 の発酵からの平板上に生存コロニーはなかった、表 11。

【0189】

対照的に、ビタミンB₁₂を加えなかった対照標準タンクからの細胞懸濁液は、グルコース供給溶液の完全な添加の故に10-Lタンクが満たされるまで、細胞塊及びグリセロールを生じ続けた（表10）。この発酵の最後における細胞懸濁液の希釈系列による寒天平板生存率決定は、光学濃度値により見積もられる合計細胞数と一致する生存細胞カウントを示した（表11）。

【0190】

【表10】

表9

E.コリ株KLP23(yqhD⁻)/pAH48/pKP32を用いるグルコースの1,3-プロパンジオール(1,3-PD)への失敗した転換の代表的な発酵の概略

時間(h)	OD ₅₅₀ (AU)	DO (%)	グルコース(g/L)	グリセロール(g/L)	1,3-PD (g/L)
0	0.4	150	11.3	0.05	0
2.3	3.0	134	10.7	0.13	0
4.3	10.8	85.0	8.2	1.41	0
8.3	23.1	81.8	0.9	10.0	0
16.3	37.2	149	13.1	21.4	0.41
18.3	47.6	149	18.9	21.6	0.39
20.3	39.6	149	24.4	22.3	0.42
23.8	33.6	149	25.4	22.0	0.41

【0191】

【表11】

表10

E.コリ株KLP23(yqhD⁻)/pAH48/pKP32を用いるグルコースのグリセロールへの転換の代表的な発酵の概略

時間(h)	OD ₅₅₀ (AU)	DO (%)	グルコース(g/L)	グリセロール(g/L)
0	0.2	148	9.5	0.06
2.2	2.8	128	8.9	0.13
4.2	10.4	58.5	7.0	1.4
8.2	21.6	57.6	2.7	11.2
16.2	76.8	10.7	0	40.5
20.2	117	10.2	0	52.9
23.7	154	8.5	0	63.9
36.2	239	10.1	0.1	122

【0192】

【表12】

表11

ビタミンB₁₂の不在下及び存在下においてE.コリ株KLP23(yqhD⁻)/pAH48/pKP32を用いるグルコースの発酵の終点からの生存率平板カウントの代表的な概略

ビタミンB ₁₂	終点における時間(h)	OD ₅₅₀ (AU)	生存カウント(cfu/mL)
なし	36.2	239	2.1E11
あり	23.8	33.6	0
あり	23.8	41.2	0

【0193】

【表13】

INDICATIONS RELATING TO A DEPOSITED MICROORGANISM

(PCT Rule 13bis)

A. The indications made below relate to the microorganism referred to in the description on page <u>12</u> , line <u>18</u>	
B. IDENTIFICATION OF DEPOSIT	
Name of depositary institution AMERICAN TYPE CULTURE COLLECTION	
Address of depositary institution (including postal code and country) 10801 University Blvd. Manassas, Virginia 20110-2209 USA	
Date of deposit 18 April 1995	Accession Number ATCC 69789
C. ADDITIONAL INDICATIONS (leave blank if not applicable)	
In respect of those designations in which a European patent is sought, a sample of the deposited microorganism will be made available until the publication of the mention of the grant of the European patent or until the date on which the application has been refused or withdrawn or is deemed to be withdrawn, only by the issue of such a sample to an expert nominated by the person requesting the sample. (Rule 28(4) EPC)	
D. DESIGNATED STATES FOR WHICH INDICATIONS ARE MADE (if the indications are not for all designated States)	
E. SEPARATE FURNISHING OF INDICATIONS (leave blank if not applicable)	
The indications listed below will be submitted to the International Bureau later (specify the general nature of the indications e.g. "Accession Number of Deposit")	
For receiving Office use only	
<input type="checkbox"/> This sheet was received with the international application	
Authorized officer	
For International Bureau use only	
<input type="checkbox"/> This sheet was received by the International Bureau on:	
Authorized officer	

Form PCT/RO/134 (July 1992)

[0194]

[表14]

INDICATIONS RELATING TO A DEPOSITED MICROORGANISM

(PCT Rule 13b(5))

A. The indications made below relate to the microorganism referred to in the description on page <u>12</u> , line <u>22</u>	
B. IDENTIFICATION OF DEPOSIT	
Name of depositary institution AMERICAN TYPE CULTURE COLLECTION	
Address of depositary institution (including postal code and country) 10801 University Blvd. Manassas, Virginia 20110-2209 USA	
Date of deposit 18 April 1995	Accession Number ATCC 69790
C. ADDITIONAL INDICATIONS (leave blank if not applicable)	
In respect of those designations in which a European patent is sought, a sample of the deposited microorganism will be made available until the publication of the mention of the grant of the European patent or until the date on which the application has been refused or withdrawn or is deemed to be withdrawn, only by the issue of such a sample to an expert nominated by the person requesting the sample. (Rule 28(4) EPC)	
D. DESIGNATED STATES FOR WHICH INDICATIONS ARE MADE (if the indications are not for all designated States)	
E. SEPARATE FURNISHING OF INDICATIONS (leave blank if not applicable)	
The indications listed below will be submitted to the International Bureau later (specify the general nature of the indications e.g. "Accession Number of Deposit")	
For receiving Office use only	
<input type="checkbox"/> This sheet was received with the international application	
Authorized officer	
For International Bureau use only	
<input type="checkbox"/> This sheet was received by the International Bureau on:	
Authorized officer	

Form PCT/RO/134 (July 1992)

[0195]

[表15]

INDICATIONS RELATING TO A DEPOSITED MICROORGANISM

(PCT Rule 13bis)

A. The indications made below relate to the microorganism referred to in the description on page <u>12</u> , line <u>30</u>	
B. IDENTIFICATION OF DEPOSIT	
Name of depositary institution AMERICAN TYPE CULTURE COLLECTION	
Address of depositary institution (including postal code and country) 10801 University Blvd. Manassas, Virginia 20110-2209 USA	
Date of deposit <u>25 November 1997</u>	Accession Number <u>ATCC 98597</u>
C. ADDITIONAL INDICATIONS (leave blank if not applicable)	
In respect of those designations in which a European patent is sought, a sample of the deposited microorganism will be made available until the publication of the mention of the grant of the European patent or until the date on which the application has been refused or withdrawn or is deemed to be withdrawn, only by the issue of such a sample to an expert nominated by the person requesting the sample. (Rule 28(4) EPC)	
D. DESIGNATED STATES FOR WHICH INDICATIONS ARE MADE (if the indications are not for all designated States)	
E. SEPARATE FURNISHING OF INDICATIONS (leave blank if not applicable)	
The indications listed below will be submitted to the International Bureau later (specify the general nature of the indications e.g. "Accession Number of Deposit")	
<div style="display: flex; justify-content: space-around;"> <div style="text-align: center;"> <p>For receiving Office use only</p> <input type="checkbox"/> This sheet was received with the international application </div> <div style="text-align: center;"> <p>For International Bureau use only</p> <input type="checkbox"/> This sheet was received by the International Bureau on:</div> </div>	
Authorized officer	

Form PCT/RO/134 (July 1992)

[0196]

[表16]

INDICATIONS RELATING TO A DEPOSITED MICROORGANISM

(PCT Rule 13bis)

A. The indications made below relate to the microorganism referred to in the description on page <u>12</u> , line <u>27</u>	
B. IDENTIFICATION OF DEPOSIT <input type="checkbox"/> Further deposits are identified on an additional sheet	
Name of depositary institution AMERICAN TYPE CULTURE COLLECTION	
Address of depositary institution (including postal code and country) 10801 University Blvd. Manassas, Virginia 20110-2209 USA	
Date of deposit 25 November 1997	Accession Number ATCC 98598
C. ADDITIONAL INDICATIONS (leave blank if not applicable) <input type="checkbox"/> This information is continued on an additional sheet	
In respect of those designations in which a European patent is sought, a sample of the deposited microorganism will be made available until the publication of the mention of the grant of the European patent or until the date on which the application has been refused or withdrawn or is deemed to be withdrawn, only by the issue of such a sample to an expert nominated by the person requesting the sample. (Rule 28(4) EPC)	
D. DESIGNATED STATES FOR WHICH INDICATIONS ARE MADE (if the indications are not for all designated States)	
E. SEPARATE FURNISHING OF INDICATIONS (leave blank if not applicable) The indications listed below will be submitted to the International Bureau later (specify the general nature of the indications e.g. "Accession Number of Deposit")	
<div style="display: flex; justify-content: space-around;"> <div style="width: 45%;"> <p>For receiving Office use only</p> <p><input type="checkbox"/> This sheet was received with the international application</p> <p>Authorized officer</p> </div> <div style="width: 45%;"> <p>For International Bureau use only</p> <p><input type="checkbox"/> This sheet was received by the International Bureau on:</p> <p>Authorized officer</p> </div> </div>	

Form PCT/RO/134 (July 1992)

【配列表】

SEQUENCE LISTING

tccatctgtc	ggcgtaaaaac	cgcgctgctc	accatcgccc	aggcgccgct	ggaagacgcc	2400
tggagttta	tggacggccg	ccccctgcgc	ctgtttattc	ttgatgagtc	cgcctgcata	2460
ctgagccgtt	cgggcgagcc	gaaaaccctg	gcccagctgg	ctgcccctgg	atttcgcgac	2520
ggcagctatt	gtggggagag	cattatcgcc	acctgcgcgc	tgtcgctgca	cgcgtatgcg	2580
ggccagccga	tcaacaccgc	cggcgatcg	catttaagc	aggcgctaca	gccatggagt	2640
ttttgtctga	cgcccggttt	tgataaccac	ggcgccgtgt	tcggctctat	ctcgctttgc	2700
tgtctggtcg	agcaccagtc	cagcggccgac	ctctccctga	cgctggccat	cgcccccgag	2760
gtgggttaact	ccctgtttac	cgacagcctg	ctggccgaaat	ccaaacgtca	cctcaatcag	2820
atgtacggcc	tgtggagag	catggacat	ggggatgtgg	cgtggaaacga	acagggcgtg	2880
ctgagtttc	tcaatgttca	ggcgccgaga	ctgctgcata	ttgtatgctca	ggccagccag	2940
gggaaaaata	tgcggatct	ggtgaccctc	ceggcgctgc	tgccgcgcgc	catcaaacac	3000
gcccgcggcc	tgaatcacgt	cgaagtacc	tttggaaatgc	agcatcagg	tgtcgatgcg	3060
gtgatcacct	taaaaccatg	tgtcgaggcg	caaggcaaca	gttttattct	gctgtgcata	3120
ccggtgagc	agatggcgca	gctgtatggc	agggcagctcg	tggaaatcag	ccacacctt	3180
gagcagatgt	ctggcgacga	tccggaaacc	cgacgcctga	tccactttgg	ccgcccaggcg	3240
gcgcgcggcg	gttcccggt	gctactgtgc	ggcgaagagg	gggttcggaa	agagctgtg	3300
agccaggcta	ttcacaatga	aaggcgaacgg	ggggcgccgc	cctacatctc	cgtcaactgc	3360
cagctatatg	ccgacagcgt	gtctggcccg	gacttattgg	gcagcgcccc	taccgacat	3420
gaaaatggc	gcgtgagcc	ccttggagctg	gccaacggcg	gcaccctgtt	tctggaaaag	3480
atcgagtttc	tggggccgga	gctgcgtcg	gtctgtgtc	aggtgattaa	gcagggcgtg	3540
ctcaccgcgc	tcgcgcgtatc	ccgggtggatg	tgaaggtgt	tgccaccacc	3600	
accgtcgatc	tggccaatct	gggtggaaacgg	aaacgcgttta	gcggccgat	gtactatgcg	3660
ctgcacttc	tttgcgtatc	catcccccgc	ctgcgcgcgc	gacgcacac	tattccgtcg	3720
ctggtgatata	accgggttga	gagctggag	aaagctttct	cttcgcgact	gaaagtggac	3780
gatgacgcgc	tggcacagct	ggtggcctac	tctggccgg	ggaatgatt	tgagctcaac	3840
agcgtatgt	agaatatacg	catcagcgc	gacaacggcc	acattcgct	gagtaatctg	3900
ccgaaatata	tctttccga	ggggccgggc	ggggatagcg	cgtcatcg	gctgcggcc	3960
agcgtactt	tttagccat	cgaaaaggaa	gttattttc	acggccgcgg	gggtgaccagc	4020
ggcggtgtc	aggagatgtc	gcagctgtc	aatatcgccc	gcaccaccc	gtggcccaaa	4080
atagaagcgt	acgatattga	cgccagccgc	ttcaagcgc	agcattcgac	ctagttctt	4140
cgattcgcgc	catggaaac	agggtatccg	acaggcgatt	gtcttagcgt	ttgagcggcgt	4200
cgcgccggcg	atgcgcgcgg	tccatggccg	tcagcaggcg	ttcgagccg	cgggactggg	4260
tgcgcgcac	gtgcagctgg	gcagaggcga	gatccctccc	cgggatcag	aactgtttt	4320
acggggccgt	ctggccat	ttgcggcttc	taaggcgctc	caggcgggt	atctcccttt	4380
cgccgatctgt	ctggctcagg	cgggtcaggc	cccgccgcata	gttggccgt	tcagccccca	4440
gcacgaacag	cgfctgtcga	atatgttgc	ggctttcccg	caggccggcg	tcgcgggtcg	4500
tggcgtagca	gacgcccac	tgggatatac	gttcatcgac	gttgcggtag	gcctcgcac	4560
gaatatggc	tttctcgat	cggtgcgcgc	cgatcaggggc	gggtgtgt	ttatccccgg	4620
tgcgggtata	gatacgatc	atttcgttcc	tctcattaa	cgccaggact	ttaaccagct	4680
gcccggcggt	ggcgccgagc	gtacgcgtt	gatcgtcgat	atcggtgac	tgtccggtag	4740
ccagccggcgc	gtccggccgc	agttggccat	gagtggggc	tatctcgcc	gacgcgtga	4800
gcccgcatacc	cacccgcagg	ggcgagcttc	tggccgcagg	ggcgcccaac	gcagggcgt	4860
cacccgcctcc	gtcatagtt	atggcttgc	agggggacccc	ctgtcttcc	agccccccagc	4920
acagcttcatt	gatggccgc	gatgtgtcc	cgccgcggatc	aaaaacagg	cgtacgctg	4980
ggcgtgaaag	cgacatgcac	gtccccctgt	taacactcag	aatgccttgc	ggaaaatcgc	5040
ggcaatctcc	tgctcgatgc	ctttaacgcgg	gttcgagaac	gcattgcgt	cttttagagc	5100
catctccgcgc	atgtagggg	agtcggccct	ttttacccccc	agatcgcc	gtatgtcgcc	5160
aataccgata	tccatcgaca	gacgcgtat	agcgccgcgt	gtttttcc	ccgcgtcgag	5220
atgtggacatgt	ccgggtatgt	tttgcgtat	cgatcaggcg	atatcgccga	atttctccgg	5280
gttggcgtatc	aggttgtatc	gcccacatg	cgccagcagg	acagcgatgg	ccaccccggt	5340
cggcatgtcg	tacaggccgc	ccagctgggt	ccacatggcg	tgcaatgc	cgagggttggc	5400
gttattggaa	ggccatcccg	ccaggcaggaga	agcataggcc	atgtttcc	gcgcctcgac	5460
atgtctccgc	aggggccacgg	cctggcgcag	gttgcggggc	ataggccga	tcgcctcgat	5520
ggccggccggcg	tccgtacccg	ggtagcgtc	tttggagata	taggccttc	cgccgtgggt	5580
cagggtatcc	atcccggcg	cccggtcag	ggggcccggt	ttaccgatca	tcagcgttgg	5640
atcggtatata	gagaccgcac	gcagtttgc	ccacatgcac	atcacaact	tcactttgg	5700
ttcgggttgc	gtcaggacgc	agtgggggt	gacccgtcg	gggggtccgg	cggtgttatt	5760
gaccgcgcac	ataggcgac	gggggtttgt	cagggtctcg	gggggtccgg	cggtgttatt	5820
atgccttcata	tgggtggcg	cgatgcgt	gcctttcccg	caatcgatc	ggctgcgcgc	5880
gcccacggcg	acgtatgtat	cgcaatgttc	ggggcgaaac	acggcgaggc	cgtcgcgcac	5940
gttgggtgtct	ttcgggttgc	gtcgcacgc	gtcaaaatgc	gccacccatc	tcccccgcctc	6000
cogcagataa	tgcagggttt	tgtccaccgc	gccccatttt	attggccgca	ggccctttgtc	6060
ggtgaccagc	agggtttttt	tccccccca	cagctggcag	cgttcgcgcga	ctacggaaat	6120
ggcgttgggg	ccaaaaaagt	taacgtttgg	caccagataa	tcaaacatc	gatacgatcat	6180

aataatacctt	ctcgcttcag	gttataatgc	ggaaaaaaacaa	tccagggcgc	actgggctaa	6240
taattgatcc	tgctcgaccg	taccggcgt	aacggccacg	gcccatta	cctgctcatt	6300
aaaaataact	ggcaggccgc	cgccaaaaat	aataattcgc	tgttggttgg	ttatgtcag	6360
accgtacaga	gattgtctg	gctggaccgc	tgacgtaatt	tcatgggtac	cttgcgttcag	6420
gctgcaggcg	ctccaggcct	tattcaggga	aatatcgac	ctggagacga	aggcctcgic	6480
catccgctgg	ataaggcagc	tgttgcctcc	gcccgtcaact	acggaaaaaca	ccaccggccac	6540
gttgcgtctca	gtggctttt	tttccaccgc	cgccgcatt	tgctgggcgg	cggccagggt	6600
gattgtctga	acttggggc	tcttgcgtcat	cattctctcc	ccgaccaggaa	taacgcgtgc	6660
gogaatagtc	agtagggggc	gataaaaaaa	aactattacc	attcgggttgg	cttgcgttat	6720
tttgcgtcag	gttattttgt	cgccgcctat	gatttagtca	atagggttaa	aatacgctcg	6780
aaaaaaacgt	attaagggcg	ttttttatta	attgattttat	atcattgcgg	gcgatcacat	6840
tttttatttt	tgccggccga	gtaaaagttc	atagtgaaaac	tgtcggtaga	tttcgtgtgc	6900
caaattgaaa	cgaaaaattaaa	tttattttt	tcaccactgg	ctcattttaa	gttccgctat	6960
tgccggtaat	ggccggccgc	caacgacgct	ggccggcgt	attcgcgtacc	gtctgcggat	7020
ttcacctttt	gagccgtatga	acaatgaaaaa	gatcaaaaacg	atttgcgtga	ctggcccagc	7080
gccccgtcaa	tcaggacggg	ctgattggcg	agtggctga	agaggggctg	atcggcatgg	7140
acagccccctt	tgacccggtc	tcttcgtat	aaatggacaa	cggtctgtac	gtcgaactgg	7200
acggcaaaacg	ccgggacacg	tttgacatga	tcgaccgatt	tatcgcgtat	tacgcgtatca	7260
acgttgagcg	cacagacgac	gcaatgcgc	ttggaggcgt	ggaaataagcc	cgtatgcgtgg	7320
tggatattca	cgtcagccgg	gaggagatca	ttgcgtatcac	taccgcate	acgcggccca	7380
aaggcgtcga	ggtgatggcg	cagatgaac	ttggggatgt	gatgtatggcg	ctgcagaaga	7440
tgctgtcccg	ccgggaccccc	tccaaaccgt	ggccacgtcac	caatctcaaa	gataatccgg	7500
tgcatgatgc	cgctgacccg	ccggggccgg	ggatggccgg	cttgcgtat	caggagacca	7560
cggtcggtat	cgccgcgtac	gcccgcgtta	acgcctggc	gctgtgtgc	gttccgcgt	7620
gccccggccc	cgccgttgg	acgcgtgtct	cggtggaaaga	ggccaccgg	ctggagctgg	7680
gcatgcgtgg	cttaaccacg	tacggcgaga	cggtgtcggt	ctacggcacc	gaaggggtat	7740
ttaccgcacgg	cgatgatacg	cggtgttcaa	aggcggtct	cgccctcgcc	tacgcctcccc	7800
ccgggttgaa	aatgcgtcac	acctccggca	ccggatccga	acgcgtgtat	ggctattcgg	7860
agagcaagtc	gatgtctac	ctcgaatcgc	gtgcgtat	cattactaaa	ggccgggggg	7920
ttcaggggact	gaaaaacggc	gcccgtggat	gtatcgcat	gaccggcgct	gtgcgtcg	7980
gcatccgggc	ggtgctggcg	gaaaaccgt	tcgcgttat	gtcgcgtat	gaagttggcg	8040
ccgccaacgca	ccagacttcc	tcccaactcg	atattccgc	caccgcgcgc	accctgtatc	8100
agatgtgtcc	gggcacccac	tttattttct	ccggctacag	cgccgtggcc	aactacgaca	8160
acatgttcgc	cggtctgaa	ttcgtatgcgg	aaatgtttga	tgattacaac	atcctgcagc	8220
gtgacactgtat	ggttgcacgc	ggccgtcgct	cggtggaccc	ggccggaaacc	attggccat	8280
gccccggaaa	ggcggggggc	atccaggcgg	ttttccgcga	gttgggggtg	ccgcgtatcg	8340
ccgacgacgg	gggtggggcc	gcccacccatc	ccgcacggcg	caacgagat	ccgcggcgta	8400
acgtgtgtgg	ggatctgtgt	gcccgtggaa	agatgtatgc	gcccacatc	accggcctcg	8460
atattgttcgg	cgccgtcgac	cgccacggct	tttgcggat	cgccacgtat	atttctcaata	8520
tgctgcgcac	gcccgttacc	ggcgattacc	tgcacgtatc	ggccatttcc	gatcggcgt	8580
tcgggggtgt	gagtgcgtc	aacgacatca	atgactatca	ggggccgggc	accggctatc	8640
gcatctctgc	cgaaacgcgt	gcccggatca	aaaatattcc	gggcgtgttt	cagccgcaca	8700
ccattgaata	aggcggtatt	cctgtgcac	agacaaccca	aattcagccc	tcttttaccc	8760
tggaaaccccg	cgagggggggg	gtatgttctg	ccgtatgtaa	cgccgtatgg	gtgggtatcg	8820
gctgtggccc	tgcccttcgt	aaacaccacg	atcacatct	gatcgtat	ccccatggcg	8880
cgtatctcaa	agagctgatt	gcccgggtgg	agaagagacgg	gottcaacgc	cggtgggtgc	8940
gcattctgcg	cacgtccgcac	gttcccttta	ttggcctggga	tgccggccac	ctgagcggt	9000
ccggggatcg	catcggtatc	cagtgcagg	ggaccacgg	catccatcg	cgcgatctgc	9060
tgccgtctcg	caacctggag	ctgttctccc	aggccggct	gctgacgtg	gagacccatc	9120
ggcagatgtgg	aaaaaacgt	gcccgtatg	cgccgttata	gtcaccttc	ccgggtggcc	9180
tggtaaacgaa	tcagatggtg	cgccgttata	ttatggccaa	agccgtatca	tttcatatca	9240
aagagaccaa	acatgtgtgt	caggacccgc	agccgtatc	gacttagt	aaatgtgtgt	9300
ggggatgtacc	atgagcgaga	aaaccatcg	ctgtggat	tatccgtat	ccaccggctg	9360
cccgagcat	atccgtacgc	ctaccggca	accattgacc	gatattacc	tcgagaaggt	9420
gctctctggc	gagggtggcc	cgccggatgt	ggggatctcc	cgccacgtat	tttagtacca	9480
ggccggatgt	gcccggacca	tgcacgtatc	ggccgtatcc	ggccggccgc	9540	
ggaggttata	gcccgttata	tccgttata	tataacgcgc	tgccggccgt	9600	
ccgctctcg	caggccggac	tgctggcgat	cgccgtatc	cttgcgtatc	ccgtatcg	9660
gacagtgtat	ggccgttttgc	tccggggatc	ggccgtatc	ttatcgatgc	ggccatataat	9720
gcttaaaaggaa	agctaagggg	aggtcgtatc	ggccgttata	ggccggatgt	atatccggca	9780
cgcacaccacc	gagggtggcc	tggcgtccgc	ctaccggcgt	gcccggccgt	ttgttgcac	9840
cgggatcg	gcccgtatc	gatcgtatc	ggccgtatc	ttatcgatgc	ggccatataat	9900
cgccgttgc	gcccgtatc	gatcgtatc	ggccgtatc	ttatcgatgc	ggccatataat	9960
tcttaaacgaa	ggccgtccgg	tgatggcga	tgtggcgat	gagaccatca	ccgagaccat	10020

tatcaccgaa tcgaccatga tcggtcataa cccgcagacg ccgggcgggg tggcggttgg 10080
 cgtggggacg actatgcgc tcggcggt ggcgacgcg cccgcggcgc agtatgcgcg 10140
 ggggtggatc gtactgattt acgacgcgt cgatttcctt gacgcgtgtt ggtggctcaa 10200
 tgaggcgctc gaccggggta tcaacgtgtt ggcggcgatc ctcaaaaagg acgacggcgt 10260
 gctgtgtgaaac aaccgcgttc gtaaaaccctt gccgggtgtt gatgaagtga cgctgtgtt 10320
 gcagggtcccc gagggggttaa tggccgggtt ggaagtggcc gcgcggggc aggtgggtcg 10380
 gatcctgtcg aatccctacg ggatcgccac cttcttcggg ctaagccccc aagagaccca 10440
 ggccatcgctc cccatcgccc gcgcgtgtt ggcgggtgtt tgctcaagac 10500
 cccgcagggg gatgtcgatc cgcgggtgtt gccggcggtt aacctctaca ttacggcg 10560
 aaagcgccgcg ggagaggccg atgtcgccga gggcgccgaa gccatcatgc aggccatgag 10620
 cgcctgcgtc cccgtacccg acatccgcgg cgaaccgggc acccacgcgc gccgcgtgtt 10680
 tgagcggttgcg ccaaggtaa tggcggttgc gaccggccat gagatgacgc cgatatacat 10740
 ccaggatctg ctggcggtgg atacgtttat cccggcgatc gtcggggcg gatggccgg 10800
 cgagtgcgcc atggagaatg ccgtcggtt ggcggcgatc tgaaagccg atcgctgtca 10860
 aatgcagggtt atcgcccgca aactgagcgc cccactgtc accgagggtgg tggtggccgg 10920
 cgtggaggcc aacatggcca tcgcggggcc gttaaaccctt cccggctgtt cggcgccgt 10980
 ggcgcgtctc gaccgcggc cccggcgac gatgtcgccgc atcgctcaacg cggaggggca 11040
 gataacggcg gtccatctcg cccggggccggg gaatatggtc agcgtgttga taaaaccga 11100
 gctggccctc gaggatcttt cgctggcgga agcgtataaa aaataccgc tggccaaagt 11160
 gaaaaggccctt ttcagttt gtcacggaa tggcggtgtt gaggttttt gggaaaggccct 11220
 cagggcgccggtt gttttccca aagtgggttga catcaaggag ggcgaactgg tgccgatcga 11280
 taacgcgcgc cccgtggaaa aaatctgtct cgtgcggccgg caggcgaaag agaaagtgtt 11340
 tgcaccaac tgcctgcgcg cgctcgccca ggtctcaccgc ggcgttcca ttgcgcataat 11400
 cgccttgcgtt gtcgtgttgcg ggggtcgatc gtcggactt gagatccgc agcttatac 11460
 ggaaggccctg tcgcactatg gtcgtgtcgcc cgggcaggggc aatattccggg gaacagaagg 11520
 gcccgcgaat ggggtcgccca cccggctgtt actggccggt caggcgaattt aaacggggcgc 11580
 tcgcgcgcgc ctctctttt aacgtgttat ttcaggatgc cgataatgaa ccagacttct 11640
 accttaaccg ggcagtgcgt ggcgcaggtt cttggcaccc gattgctcat ttcttcggc 11700
 gcgccgtcgcc tcgtcgccgc ggggtcgcc gggggccagct tgggtcaatgg gtagatcagt 11760
 attatctggg gccttggcgatc cccatggcc atctacactga cggccgggtt otccggcg 11820
 cacctaaatc cggcggtgac cattggccctg tggctgttgc cctgttttga acgcccgaag 11880
 gtgcgtccgtt tatttgcgc ccagacggcc gggcccttc ggcgcgcgc gtcgggttat 11940
 gggctctatc gccagctgtt tccatgttcc gaaacagatgc agcatatgtt ggcggcact 12000
 gcccgcgcgc ttaacctggc cggggctttt tccacgtacc cgcacccaca tatcaactttt 12060
 atacaaggctt tggcggttgc gaccacccatc acggcaatcc tgcgtggcgat gatcatggcc 12120
 ctgaccgacg acggcaacagg aattt 12145

<210> 2
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Unknown

 <220>
 <223> Description of Artificial Sequence: primer

<220>
 <223> primer

<400> 2
 gctttctgtt ctgcggcttt ag

22

<210> 3
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence: primer

<220>
 <223> primer

<400> 3
 tggtcgagga tccacttcac ttt

23

<210> 4
<211> 51
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: primer

<220>
<223> primer

<400> 4
aaagtgaagt ggatcctcga ccaattggat ggtggcgcaag tagcaaacaa t 51

<210> 5
<211> 23
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: primer

<220>
<223> primer

<400> 5
ggatcaccgc cgccagaaact acg 23

<210> 6
<211> 25
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: primer

<220>
<223> primer

<400> 6
ctgtcagccg ttaagtgttc ctgtg 25

<210> 7
<211> 23
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: primer

<220>
<223> primer

<400> 7
cagttcaacc tggatgtt acg 23

<210> 8
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: primer

```

<220>
<223> primer

<400> 8
atgagtcaaa catcaacacctt 20

<210> 9
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: primer

<220>
<223> primer

<400> 9
atggagaaaaa aaatcactgg 20

<210> 10
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: primer

<220>
<223> primer

<400> 10
ttacgcccccg ccctgccact 20

<210> 11
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: primer

<220>
<223> primer

<400> 11
tcagaggatg tgcacactgca 20

<210> 12
<211> 26
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: primer

<220>
<223> primer

<400> 12
cgagcatgcc gcatttggca ctactc 26

```

```

<210> 13
<211> 29
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: primer

<220>
<223> primer

<400> 13
gcgtctagag taggttattc ccactcttg                                29

<210> 14
<211> 26
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: primer

<220>
<223> primer

<400> 14
gaagtgcacc gctgcgcctt atccgg                                26

<210> 15
<211> 28
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: primer

<220>
<223> primer

<400> 15
cgcgtcgacg tttacaattt caggtggc                                28

<210> 16
<211> 23
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: primer

<220>
<223> primer

<400> 16
gcagcatgct ggactggtag tag                                23

<210> 17
<211> 27
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: primer

```

```

<220>
<223> primer

<400> 17
cagtctagag ttattggc&a acctacc 27

<210> 18
<211> 25
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: primer

<220>
<223> primer

<400> 18
gatgcatgcc cagggcggag acggc 25

<210> 19
<211> 29
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: primer

<220>
<223> primer

<400> 19
ctaacgattg ttctctagag aaaatgtcc 29

<210> 20
<211> 30
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: primer

<220>
<223> primer

<400> 20
cacgcatgca gttcaacctg ttgatagtagc 30

<210> 21
<211> 28
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: primer

<220>
<223> primer

<400> 21
gcgtctagat ccttttaaat taaaaatg 28

<210> 22
<211> 51

```

```

<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: primer

<220>
<223> primer

<400> 22
gcgcggatcc aggagtctag aattatggga ttgactacta aacctctatc t      51

<210> 23
<211> 36
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: primer

<220>
<223> primer

<400> 23
gatacgcccg ggttaccatt tcaacagatc gtcctt      36

<210> 24
<211> 34
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: primer

<220>
<223> primer

<400> 24
ttgataatat aaccatggct gctgctgctg atag      34

<210> 25
<211> 39
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: primer

<220>
<223> primer

<400> 25
gtatgatatg ttatcttggta tccaaataat ctaatcttc      39

<210> 26
<211> 24
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: primer

<220>
<223> primer

```

<400> 26		
catgactagt aaggaggaca attc		24
<210> 27		
<211> 24		
<212> DNA		
<213> Artificial Sequence		
<220>		
<223> Description of Artificial Sequence: primer		
<220>		
<223> primer		
<400> 27		
catggaattg tcctcattac tagt		24
<210> 28		
<211> 19		
<212> DNA		
<213> Artificial Sequence		
<220>		
<223> Description of Artificial Sequence: primer		
<220>		
<223> primer		
<400> 28		
ctagtaagga ggacaattc		19
<210> 29		
<211> 19		
<212> DNA		
<213> Artificial Sequence		
<220>		
<223> Description of Artificial Sequence: primer		
<220>		
<223> primer		
<400> 29		
catggaattg tcctcattta		19
<210> 30		
<211> 15		
<212> DNA		
<213> Artificial Sequence		
<220>		
<223> Description of Artificial Sequence: primer		
<220>		
<223> primer		
<400> 30		
gatccaggaa acaga		15
<210> 31		
<211> 15		
<212> DNA		
<213> Artificial Sequence		

```

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: primer

<220>
<223> primer

<400> 31
ctagtctgtt tcctg 15

<210> 32
<211> 94
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: terminator
sequence

<220>
<223> terminator sequence

<400> 32
agcttaggag tctagaatat tgagctcgaa ttcccgccca tgccgtaccg gatccagaaa 60
aaagcccgca cctgacagtg cggctttt tttt 94

<210> 33
<211> 37
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: primer

<220>
<223> primer

<400> 33
ggaattcaga tctcagcaat gagcgagaaa accatgc 37

<210> 34
<211> 27
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: primer

<220>
<223> primer

<400> 34
gtcttagatt agtttccttt acgcagc 27

<210> 35
<211> 33
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: primer

<220>
<223> primer

```

<400> 35		
ggccaagctt aaggaggta attaaatgaa aag		33
<210> 36		
<211> 26		
<212> DNA		
<213> Artificial Sequence		
<220>		
<223> Description of Artificial Sequence: primer		
<220>		
<223> primer		
<400> 36		
gctcttagatt attcaatggt gtcggg		26
<210> 37		
<211> 42		
<212> DNA		
<213> Artificial Sequence		
<220>		
<223> Description of Artificial Sequence: primer		
<220>		
<223> primer		
<400> 37		
gcgccgtcta gaattatgag ctatcgatg tttgattatc tg		42
<210> 38		
<211> 36		
<212> DNA		
<213> Artificial Sequence		
<220>		
<223> Description of Artificial Sequence: primer		
<220>		
<223> primer		
<400> 38		
tctgataacgg gatcctcaga atgcctggcg gaaaat		36
<210> 39		
<211> 18		
<212> DNA		
<213> Artificial Sequence		
<220>		
<223> Description of Artificial Sequence: linker		
<220>		
<223> linker		
<400> 39		
tcgacgaatt caggagga		18
<210> 40		
<211> 18		
<212> DNA		
<213> Artificial Sequence		

catggaaattt	aacacccctgag	acaacttggtt	acagctcaac	agtccacacat	agacagcgtt	2580
aaacaggcga	tgcgttcttat	cgaatcaaag	ctggccgacaa	cacgggagcc	agtgacgcct	2640
ccctgtggga	aaaaatcatg	gcattctgg	aagaatatgc	gctttcagcc	ggcaaaacccg	2700
ctgaagccac	atctcgcat	ctgtataacaa	actagcaaca	ccagaacacg	cgctttcgcc	2760
gcgcaaaac	ccctgggat	taattccctt	gctcgccgag	gctgggtgcc	aaatctcggt	2820
gtaacatcaa	ggcccgatcc	ttggagccct	tgccctcccg	cacgatgatc	gtgccgtgat	2880
cgaaatccag	atcccttgacc	cgcgttgca	aaccctcaact	gatcccgatc	cccggttccat	2940
acagaagctg	ggcgaacaaa	cgtatctgc	cttccggaaa	accggaggatc	cgaaaccactt	3000
catccggggt	cagcaccacc	gcaagcgcc	gcgacggcc	aggcttcgg	atctcttgc	3060
gccaggggcg	atccgtgcac	agcacttgc	cgtagaagaa	cagaaggcc	gccaatgcct	3120
gacgatgcgt	ggagaccgaa	accttgcgt	cgttcgccag	ccaggacaga	aatgcctcga	3180
cttcgtctgt	gccccaaagg	gcccgggtgac	gcacaccgt	gaaacggatc	aggcacgca	3240
cccagtggac	ataaagcttgc	tggttctgt	agctgtatgc	caatgcgt	atgcgcctc	3300
gcaatgttc	cagaacatttgc	accgaacgca	gcgggtgtt	cggccagtg	gccccgttca	3360
tggcttggta	tgactgtttt	tttggggta	agtctatgc	tcgggcatcc	aagcagcaag	3420
cgcggttacgc	cgtgggtcga	tgtttgcgt	tatggagcag	caacgatgtt	acgcagcagg	3480
gcagtcgccc	taaaaacaaag	ttaaacatca	tgagggaaagc	ggtgtatgc	gaagtatcga	3540
ctcaactatac	agaggtatgt	ggcgtatcatc	agccatct	cgaacccgc	tgcgttggcc	3600
tatatttgc	cggtccgc	tggtatggcg	gccttgcgg	acacatgtat	attgtatgg	3660
tgggttacgg	gaccgtttaagg	cttgcgtt	caacgcggcg	agcttgc	aacgaccc	3720
tggaaacttc	ggcttccctt	ggagagagcg	agattctcg	cgctgtagaa	gtcaccattt	3780
tgtgtcaca	cgacatcatt	ccgtggcg	atccagctt	gcccgcact	caattttggag	3840
aatggcagcg	caatgcattt	cttgcggat	tcttcggatc	agccacgc	gacattgtatc	3900
tggctatctt	gctgacaaaa	gcaagagaaac	atagctgtc	cttggtaggt	ccagcggccg	3960
aggaactctt	tgatccgg	cctgtacacgg	atctatttgc	ggcgttaaat	gaaacc	4020
cgctatggaa	ctcgccgccc	gactgggct	gogatgacgc	aaatgtatgt	tttacgttgc	4080
cccgatcttgc	gtacacgc	gtaaacccggca	aaatcgcgc	gaaggatgtc	gtcgcgcact	4140
ggcaatggat	gcccgttgc	gcccgtatc	agccgcgt	atgttgcgt	agacaggctt	4200
atcttggaca	agaagaagat	cgcttggct	cgccgcgc	tcagggttgc	gaaatttgc	4260
actacgttgc	aggcgagatc	accaaggtag	tgcgttacaa	atgttgc	attcggttca	4320
gcccgcacccg	cttcggccgc	cggttactt	caagcggtt	atgcactaa	cacataattt	4380
ctcacagccaa	aactatcagg	tcaagtctgc	tttttattt	tttaacgttgc	cataataaagc	4440
cctacacacca	tttggggat	ttatcatggaa	ggcttgcgtt	ttcttgcgtt	cgcaatagt	4500
ggcgaagttt	tcgcaacatc	cgcat	tctagcgagg	gctttacta		4549

```
<210> 42
<211> 199
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
```

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: glucose isomerase promoter

<220>
<223> promoter

```
<400> 42
gaattcacta gtcgatctgt gctgtttgcc acggtatgca gcaccaggcgc gagattatgg 60
gctcgacgc tcgactgtcg gacgggggca ctggaacgag aagtcaaggcg agccgtcacg 120
cccttgacaa tgccacatcc tgagcaaata attcaaccac taaacaaatc aaccgcgttt 180
ccccgaggtt accaagctt 199
```

<210> 43
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: primer

<220>
<223> primer

<400> 43	gacgcaacag tattccgtcg c	21
<210> 44		
<211> 42		
<212> DNA		
<213> Artificial Sequence		
<220>		
<223> Description of Artificial Sequence: primer		
<220>		
<223> primer		
<400> 44	atgagctatc gtatgttccg ccaggcattc tgagtgttaa cg	42
<210> 45		
<211> 33		
<212> DNA		
<213> Artificial Sequence		
<220>		
<223> Description of Artificial Sequence: primer		
<220>		
<223> primer		
<400> 45	gcctggcgga acatacgata gctcataata tac	33
<210> 46		
<211> 21		
<212> DNA		
<213> Artificial Sequence		
<220>		
<223> Description of Artificial Sequence: primer		
<220>		
<223> primer		
<400> 46	cggggcgctg ggccagtact g	21
<210> 47		
<211> 28		
<212> DNA		
<213> Artificial Sequence		
<220>		
<223> Description of Artificial Sequence: primer		
<220>		
<223> primer		
<220>		
<223> primer		
<400> 47	tcaaaccggg tggttctcg cgaccggg	28
<210> 48		
<211> 28		

```

<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: primer

<220>
<223> primer

<400> 48 ..... 28
      ctcagccgga tatcgacggc gcgctggc

<210> 49
<211> 60
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: primer

<220>
<223> primer

<400> 49
      accagcgcgc cgtcgatatac cggctgagta ctcaaacacct gccagcttt tacgcagg 60

<210> 50
<211> 28
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: primer

<220>
<223> primer

<400> 50 ..... 28
      cagcatgcct gcgaaccaca ggcctatc

<210> 51
<211> 28
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: primer

<220>
<223> primer

<400> 51 ..... 28
      atgaacaagaat ggggcgtagg gttaacat

<210> 52
<211> 28
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: primer

<220>
<223> primer

```

<400> 52			28			
ttaattactt	gatttattgt	cggcttta				
<210> 53						
<211> 1380						
<212> DNA						
<213> <i>Saccharomyces cerevisiae</i>						
<400> 53						
ctttaatttt	cttttatctt	actctcctac	ataagacatc	aagaaacaat	tgtatattgt	60
acacccccc	cctccacaaa	cacaatattt	gataatataa	agatgtctgc	tgctgctgat	120
agattaaact	taacttccgg	ccacttgaat	gctggtagaa	agagaagttc	cictctgtt	180
tcttgcagg	ctgcggaaaa	gccttcaag	ttactgtga	ttggatctgg	taactgggt	240
actactattt	ccaagggtgt	tgccgaaaat	tgtaagggtat	acccagaagt	tttcgctcca	300
atagtacaaa	tgtgggtgtt	cgaagaagag	atcaatggtg	aaaatgtac	tgaatcata	360
aatactagac	atcaaaccat	cctggcatca	ctctaccga	caatttggtt		420
gctaattccg	acttgattga	ttcagtcag	gatgtgcaca	tcatcggtt	caacattcca	480
catcaatttt	tgcccgat	ctgtagccat	ttgaaagggtc	atgttgcattc	acacgtcaga	540
gctatctcc	gtctaaagg	ttttaagtt	ggtctaaag	gtgtcaattt	gctatccctt	600
tacatcaact	aggaaactagg	tattcaatgt	gtgtctctat	ctgggtctaa	cattgcccacc	660
gaagtcgctc	aagaacactg	gtctgaaaca	acagttgtct	accacatttc	aaaggatttc	720
agaggcgagg	gcaaggacgt	cgaccataag	gttctaaagg	ccttggttca	cagacatttc	780
ttccacgtt	gtgtcatcga	agatgttgc	ggtatctcca	tctgtggc	tttgaagaac	840
gttggcct	taggttggtt	tttcgtcgaa	ggtctaggct	ggggtaacaa	cgcttctgct	900
gccccatccaa	gagtcggtt	gggtgagatc	atcagattcg	gtcaaatgtt	tttcccagaa	960
tttagagaaag	aaacatacta	ccaaagatct	gtctgggttt	ctgatttgat	caccacctgc	1020
gctgggttta	gaaacgtcaa	ggttgcattt	ctaatggctt	cttctgttaa	ggacgcctgg	1080
gaatgtgaaa	aggagttgtt	gaatggccaa	tccgctcaag	gtttaattac	ctgcaaaagaa	1140
gttcacgaat	ggttggaaac	atgggtctt	gtcgaagact	tcccatattt	tgaagccgta	1200
tacccaaatcg	tttacaacaa	ctacccaaatg	aagaacactgc	cggacatgtat	tgaagaattt	1260
gatctcatcg	aagattagat	tatttggaga	aagataacat	atcatacttc	ccccactttt	1320
ttcgaggctc	ttctatata	tattcataaa	tttagcattat	gtcatttctc	ataactactt	1380
<210> 54						
<211> 391						
<212> PRT						
<213> <i>Saccharomyces cerevisiae</i>						
<400> 54						
Met Ser Ala Ala Ala Asp Arg Leu Asn Leu Thr Ser Gly His Leu Asn						
1	5	10	15			
Ala Gly Arg Lys Arg Ser Ser Ser Val Ser Leu Lys Ala Ala Glu						
20	25	30				
Lys Pro Phe Lys Val Thr Val Ile Gly Ser Gly Asn Trp Gly Thr Thr						
35	40	45				
Ile Ala Lys Val Val Ala Glu Asn Cys Lys Gly Tyr Pro Glu Val Phe						
50	55	60				
Ala Pro Ile Val Gln Met Trp Val Phe Glu Glu Glu Ile Asn Gly Glu						
65	70	75	80			
Lys Leu Thr Glu Ile Ile Asn Thr Arg His Gln Asn Val Lys Tyr Leu						
85	90	95				
Pro Gly Ile Thr Leu Pro Asp Asn Leu Val Ala Asn Pro Asp Leu Ile						
100	105	110				
Asp Ser Val Lys Asp Val Asp Ile Ile Val Phe Asn Ile Pro His Gln						
115	120	125				

Phe Leu Pro Arg Ile Cys Ser Gln Leu Lys Gly His Val Asp Ser His
 130 135 140
 Val Arg Ala Ile Ser Cys Leu Lys Gly Phe Glu Val Gly Ala Lys Gly
 145 150 155 160
 Val Gln Leu Leu Ser Ser Tyr Ile Thr Glu Glu Leu Gly Ile Gln Cys
 165 170 175
 Gly Ala Leu Ser Gly Ala Asn Ile Ala Thr Glu Val Ala Gln Glu His
 180 185 190
 Trp Ser Glu Thr Thr Val Ala Tyr His Ile Pro Lys Asp Phe Arg Gly
 195 200 205
 Glu Gly Lys Asp Val Asp His Lys Val Leu Lys Ala Leu Phe His Arg
 210 215 220
 Pro Tyr Phe His Val Ser Val Ile Glu Asp Val Ala Gly Ile Ser Ile
 225 230 235 240
 Cys Gly Ala Leu Lys Asn Val Val Ala Leu Gly Cys Gly Phe Val Glu
 245 250 255
 Gly Leu Gly Trp Gly Asn Asn Ala Ser Ala Ala Ile Gln Arg Val Gly
 260 265 270
 Leu Gly Glu Ile Ile Arg Phe Gly Gln Met Phe Phe Pro Glu Ser Arg
 275 280 285
 Glu Glu Thr Tyr Tyr Gln Glu Ser Ala Gly Val Ala Asp Leu Ile Thr
 290 295 300
 Thr Cys Ala Gly Gly Arg Asn Val Lys Val Ala Arg Leu Met Ala Thr
 305 310 315 320
 Ser Gly Lys Asp Ala Trp Glu Cys Glu Lys Glu Leu Leu Asn Gly Gln
 325 330 335
 Ser Ala Gln Gly Leu Ile Thr Cys Lys Glu Val His Glu Trp Leu Glu
 340 345 350
 Thr Cys Gly Ser Val Glu Asp Phe Pro Leu Phe Glu Ala Val Tyr Gln
 355 360 365
 Ile Val Tyr Asn Asn Tyr Pro Met Lys Asn Leu Pro Asp Met Ile Glu
 370 375 380
 Glu Leu Asp Leu His Glu Asp
 385 390
 <210> 55
 <211> 753
 <212> DNA
 <213> *Saccharomyces cerevisiae*
 <400> 55
 atgggatgta ctactaaacc tctatctttg aaagtttaacg ccgccttgggtt cgacgtcgac 60
 ggttaccatata tcatactctca accagccatt gctgcattct ggagggattt cggttaaggac 120
 aaacaccttatt tcgatgtctga acaacgttatac caagtctcgc atgggttggag aacgtttgtat 180
 gccatttgctta agttcgtctcc agactttgcc aatgaagagt atgttaacaa attagaagct 240
 gaaattccgg tcaagttacgg tggaaaaatcc attgaagttcc caggtgcagt taagctgtgc 300
 aacgctttga acgctctacc aaaagagaaaa tgggtgtgg caacttccgg taccctgtat 360
 atggcacaaaa aatgggttcga gcatctggga atcaggagac caaagtactt cattaccgct 420

aatgatgtca aacaggtaa gcctcatcca gaaccatatac tgaagggcag gaatggctta 480
 gatatccga tcaatgagca agacccttcc aaatctaagg tagtagtatt tgaagacgct 540
 ccagcaggtt ttgcgcggg aaaaagccgc ggttgtaaaga tcattggtat tgccactact 600
 ttcgacttgg acttctaaa gaaaaaaggc tttgacatca ttgtcaaaaa ccaacgaatcc 660
 atcagagttt gcggtacaa tgccaaaca gacgaagttt aattcatttt tgacgactac 720
 ttatatgcta aggacgatct gttgaaatgg taa 753

<210> 56
 <211> 250
 <212> PRT
 <213> *Saccharomyces cerevisiae*

<400> 56
 Met Gly Leu Thr Thr Lys Pro Leu Ser Leu Lys Val Asn Ala Ala Leu
 1 5 10 15

Phe Asp Val Asp Gly Thr Ile Ile Ser Gln Pro Ala Ile Ala Ala
 20 25 30

Phe Trp Arg Asp Phe Gly Lys Asp Lys Pro Tyr Phe Asp Ala Glu His
 35 40 45

Val Ile Gln Val Ser His Gly Trp Arg Thr Phe Asp Ala Ile Ala Lys
 50 55 60

Phe Ala Pro Asp Phe Ala Asn Glu Glu Tyr Val Asn Lys Leu Glu Ala
 65 70 75 80

Glu Ile Pro Val Lys Tyr Gly Glu Lys Ser Ile Glu Val Pro Gly Ala
 85 90 95

Val Lys Leu Cys Asn Ala Leu Asn Ala Leu Pro Lys Glu Lys Trp Ala
 100 105 110

Val Ala Thr Ser Gly Thr Arg Asp Met Ala Gln Lys Trp Phe Glu His
 115 120 125

Leu Gly Ile Arg Arg Pro Lys Tyr Phe Ile Thr Ala Asn Asp Val Lys
 130 135 140

Gln Gly Lys Pro His Pro Glu Pro Tyr Leu Lys Gly Arg Asn Gly Leu
 145 150 155 160

Gly Tyr Pro Ile Asn Glu Gln Asp Pro Ser Lys Ser Lys Val Val Val
 165 170 175

Phe Glu Asp Ala Pro Ala Gly Ile Ala Ala Gly Lys Ala Ala Gly Cys
 180 185 190

Lys Ile Ile Gly Ile Ala Thr Thr Phe Asp Leu Asp Phe Leu Lys Glu
 195 200 205

Lys Gly Cys Asp Ile Ile Val Lys Asn His Glu Ser Ile Arg Val Gly
 210 215 220

Gly Tyr Asn Ala Glu Thr Asp Glu Val Glu Phe Ile Phe Asp Asp Tyr
 225 230 235 240

Leu Tyr Ala Lys Asp Asp Leu Leu Lys Trp
 245 250

<210> 57
 <211> 387

<212> PRT
<213> *E. coli*

<400> 57

Met Asn Asn Phe Asn Leu His Thr Pro Thr Arg Ile Leu Phe Gly Lys	1	5	10	15
Gly Ala Ile Ala Gly Leu Arg Glu Gln Ile Pro His Asp Ala Arg Val	20	25	30	
Leu Ile Thr Tyr Gly Gly Ser Val Lys Lys Thr Gly Val Leu Asp	35	40	45	
Gln Val Leu Asp Ala Leu Lys Gly Met Asp Val Leu Glu Phe Gly Gly	50	55	60	
Ile Glu Pro Asn Pro Ala Tyr Glu Thr Leu Met Asn Ala Val Lys Leu	65	70	75	80
Val Arg Glu Gln Lys Val Thr Phe Leu Leu Ala Val Gly Gly Ser	85	90	95	
Val Leu Asp Gly Thr Lys Phe Ile Ala Ala Ala Asn Tyr Pro Glu	100	105	110	
Asn Ile Asp Pro Trp His Ile Leu Gln Thr Gly Gly Lys Glu Ile Lys	115	120	125	
Ser Ala Ile Pro Met Gly Cys Val Leu Thr Leu Pro Ala Thr Gly Ser	130	135	140	
Glu Ser Asn Ala Gly Ala Val Ile Ser Arg Lys Thr Thr Gly Asp Lys	145	150	155	160
Gln Ala Phe His Ser Ala His Val Gln Pro Val Phe Ala Val Leu Asp	165	170	175	
Pro Val Tyr. Thr Tyr Thr Leu Pro Pro Arg Gln Val Ala Asn Gly Val	180	185	190	
Val Asp Ala Phe Val His Thr Val Glu Gln Tyr Val Thr Lys Pro Val	195	200	205	
Asp Ala Lys Ile Gln Asp Arg Phe Ala Glu Gly Ile Leu Leu Thr Leu	210	215	220	
Ile Glu Asp Gly Pro Lys Ala Leu Lys Glu Pro Glu Asn Tyr Asp Val	225	230	235	240
Arg Ala Asn Val Met Trp Ala Ala Thr Gln Ala Leu Asn Gly Leu Ile	245	250	255	
Gly Ala Gly Val Pro Gln Asp Trp Ala Thr His Met Leu Gly His Gl	260	265	270	
Leu Thr Ala Met His Gly Leu Asp His Ala Gln Thr Leu Ala Ile Va	275	280	285	
Leu Pro Ala Leu Trp Asn Glu Lys Arg Asp Thr Lys Arg Ala Lys Le	290	295	300	
Leu Gln Tyr Ala Glu Arg Val Trp Asn Ile Thr Glu Gly Ser Asp As	305	310	315	32

Glu Arg Ile Asp Ala Ala Ile Ala Ala Thr Arg Asn Phe Phe Glu Gln
 325 330 335
 Leu Gly Val Pro Thr His Leu Ser Asp Tyr Gly Leu Asp Gly Ser Ser
 340 345 350
 Ile Pro Ala Leu Leu Lys Lys Leu Glu Glu His Gly Met Thr Gln Leu
 355 360 365
 Gly Glu Asn His Asp Ile Thr Leu Asp Val Ser Arg Arg Ile Tyr Glu
 370 375 380
 Ala Ala Arg
 385

<210> 58
<211> 1164
<212> DNA
<213> *E. coli*

<400> 58	atgaacaact	ttaatctgca	caccccaacc	cgcattctgt	ttggtaaagg	cgcaatcgct	60
ggtttacgcg	aacaattcc	tcacgatgtc	cgcgatattga	ttacttacgg	ggcgccgacg		120
gtgaaaaaaaa	cccggttct	cgatcaattt	ctggatgccc	tgaaggcat	ggacgtgtcg		180
gaatttggcg	gtattgagcc	aaacccggct	tatgaaacgc	tgatgaacgc	cgtgaaactig		240
gttcgcgaac	agaaaagtgac	tttcctgtcg	gcgggttggcg	gcgggttctgt	actggacggc		300
accaaaaattt	tcggccgacg	ggctaactat	cggggaaata	tcgatccgtg	gcacattctgt		360
caaaggcgcg	gtaaagagat	taaaaggcgc	atcccgatgt	gtctgtgtgt	gacgctgcca		420
gcaaccgggtt	caagaatccaa	cgcaggcgcg	gtgatctccc	gtaaaaccac	aggcgacaag		480
caggcgttcc	attctgcccc	tgttcagccg	gtatattgcgc	tgctcgatcc	ggtttatacc		540
tacacccttc	cgccggcgtca	ggtggggatd	ggcgtagtgg	acgcctttgt	acacaccgtg		600
gaacagtatg	ttaccaaacc	ggtttagatgc	aaaatttcagg	acgggttctgc	agaaggcatt		660
ttgtcgacgc	taatcgaaaa	gttgcggaaa	gccctgaaag	agccagaaaa	ctacgatgtg		720
cgcgccaaacg	tcatgtgggc	ggcgactctag	gctgtgaacg	gttggatttgg	cgctggcgta		780
ccgcaggact	gggcacacgc	tatgtctgggg	cacgaactga	ctgcatgtca	cggtctggat		840
cacggcgaaa	cactggctat	cgtctctgcct	gcactgttga	atggaaaaacg	cgatatacca		900
cgcgcttaacg	tgctgtcaata	tgctgaacgc	gtctggaaaca	tcactgaagg	ttcccgatgt		960
gagcgttattt	acgcggcgat	tgccgcaacc	cgcaattttt	ttgagcaattt	aggcggtggcg		1020
accacacccct	ccgactactgg	tctggacggc	agctccatcc	cggctttgtct	aaaaaaacttg		1080
gaagagacgc	gcatgaccca	actggggcga	aatcatgaca	ttacgttgg	tgtcagccgc		1140
cgtatatacg	aagccggcccg	ctaa					1164

<210> 59
<211> 32
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:Primer

<400> 59
gcgggtaccgt tgctcgacgc tcaggttttc gg 32

<210> 60
<211> 33
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:Primer

<400> 60	
gcgagctcg a cgcttgcct gatcgagttt tgc	33
<210> 61	
<211> 33	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220>	
<223> Description of Artificial Sequence:Primer	
<400> 61	
gcgagctcg a cgcttgcct gatcgagttt tgc	33
<210> 62	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220>	
<223> Description of Artificial Sequence:Primer	
<400> 62	
cagctggcaa ttccggttcg	20
<210> 63	
<211> 30	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220>	
<223> Description of Artificial Sequence:Primer	
<400> 63	
cccagctggc aattccggtt cgcttgctgt	30
<210> 64	
<211> 30	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220>	
<223> Description of Artificial Sequence:Primer	
<400> 64	
ggcgaccgga cgctccagac ggaagctgg	30
<210> 65	
<211> 30	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
?	
<220>	
<223> Description of Artificial Sequence:Primer	
<400> 65	
ccgcaagatt cacggatgca tcgtgaaggg	30

```

<210> 66
<211> 27
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:Primer

<400> 66
cgcccttcttg acgaggctctg agcgggg 27

<210> 67
<211> 30
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:Primer

<400> 67
ggaattccatg aacaacttta atctgcacac 30

<210> 68
<211> 30
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:Primer

<400> 68
gtttgaggcg taaaaagctt agcggggggc 30

```

【図面の簡単な説明】

【図 1】

d h a レギュロンサブクローン p HK 28-26 の配列内の遺伝子体制。

【図 2】

本質的に実施例 7 に記載するビタミン B₁₂ の一定の供給を用いた 2 つの発酵実験の間で比較される細胞外可溶性タンパク質 (g/L) のグラフ。

【図 3】

本質的に実施例 7 に記載するビタミン B₁₂ の一定の供給を用いた 2 つの発酵実験の間で比較される細胞生存率 [(生存細胞/mL) / OD 550] のグラフ。

【図 4】

本質的に実施例 7 に記載する、しかしビタミン B₁₂ 又は補酵素 B₁₂ の不在下における 2 つの発酵実験の間で比較されるグルコースからのグリセロールの収率のグラフ。

【図 5】

1, 3-プロパンジオールへのグルコースの代謝的転換を示す流れ図。

【図6】

未変性ゲル上の内因性E. コリオキシドレダクターゼ活性（非一特異的触媒活性）を示すバンドから抽出される可溶性タンパク質画分を用いた2D-PAGE膜プロット。

【図1】

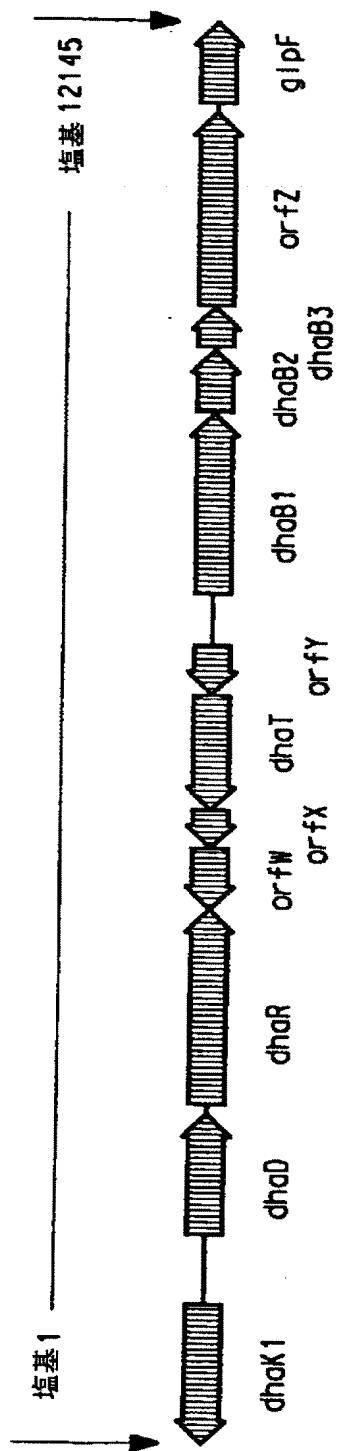


FIG. 1

【図2】

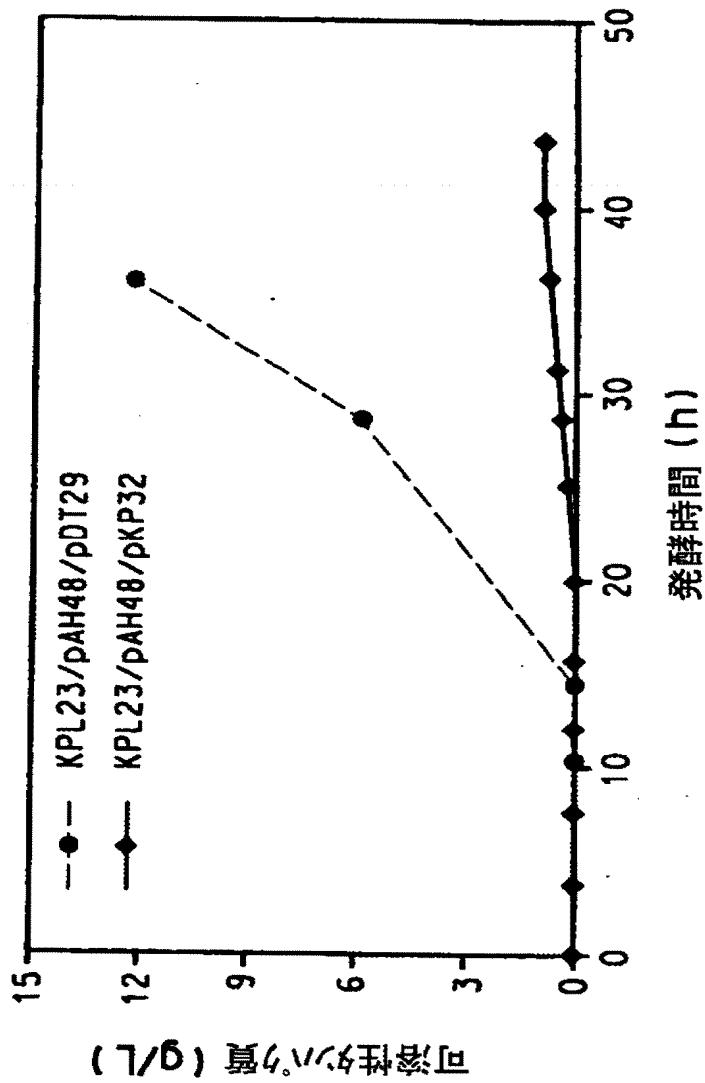


FIG. 2

【図3】

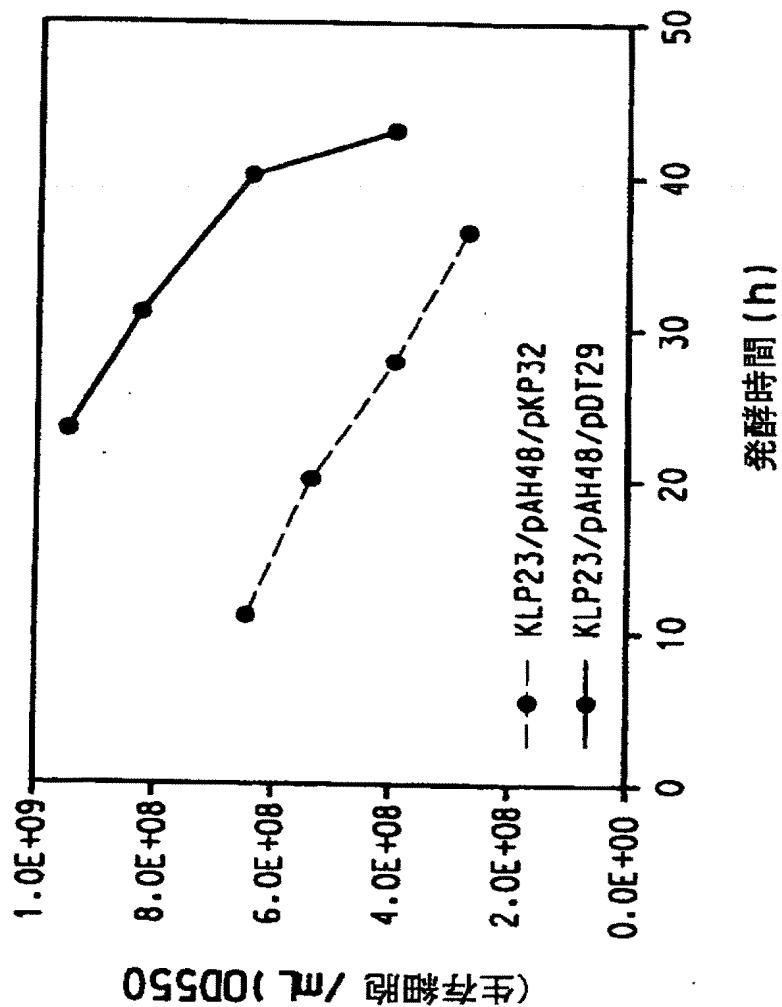


FIG. 3

【図4】

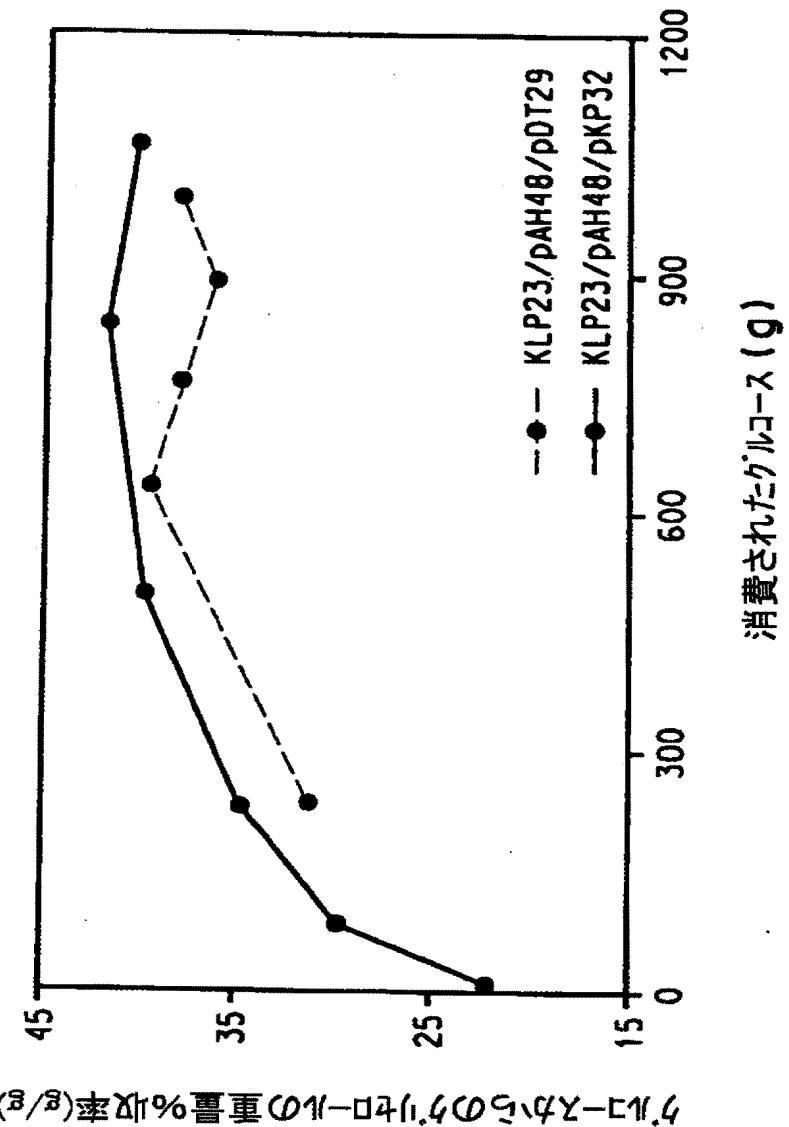


FIG. 4

【図5】

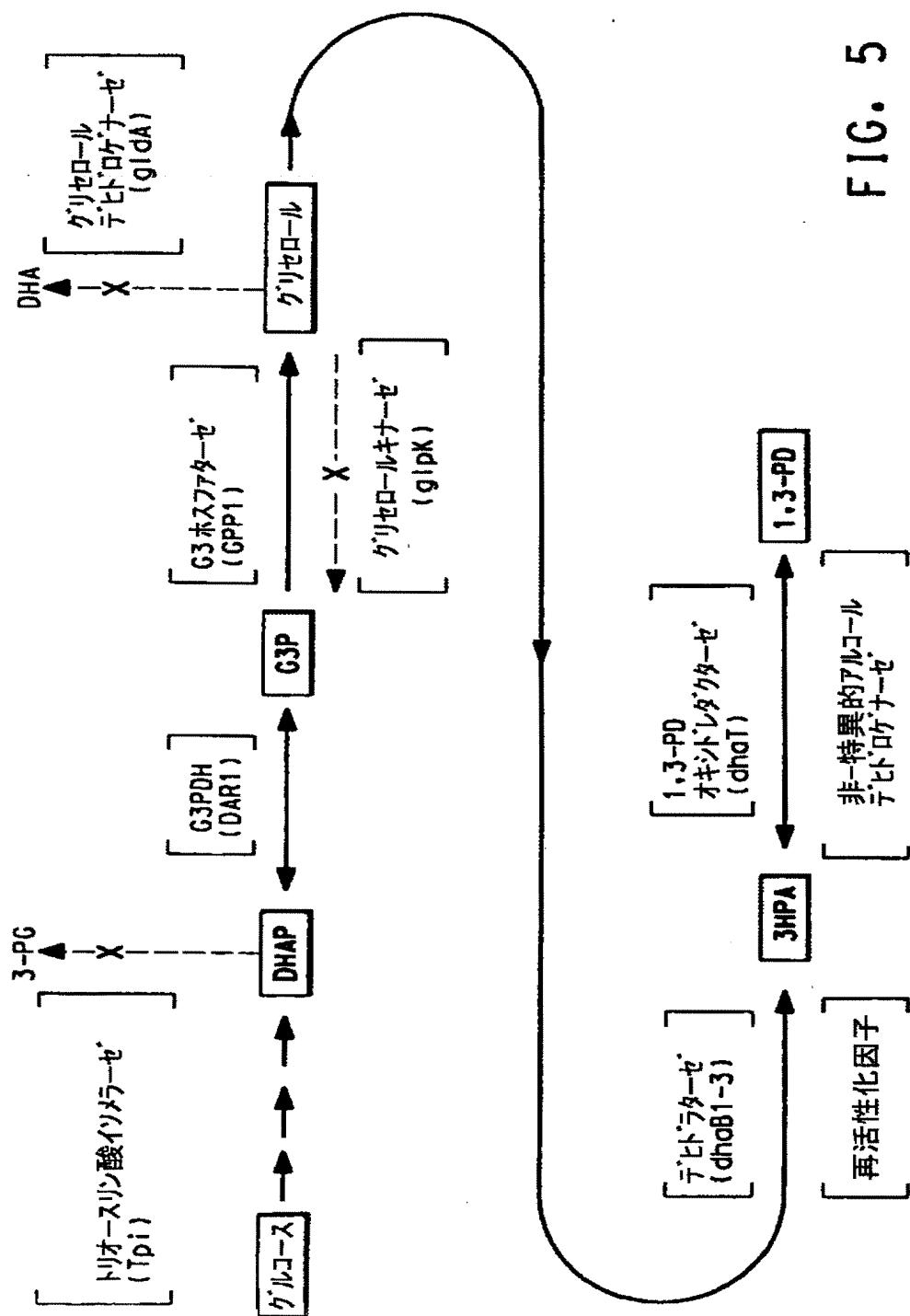


FIG. 5

【図6】

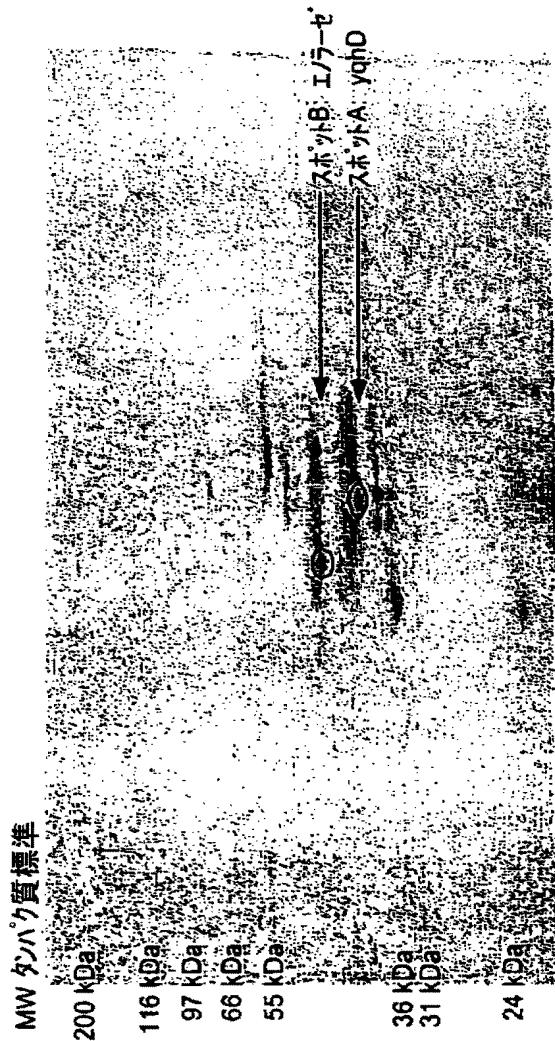


FIG. 6

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

		Int. Application No PCT/US 00/22874						
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 C12N15/52 C12N15/70 C12P7/18 C12N9/04 C12N1/21 // (C12N1/21, C12R1:19)								
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC								
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 7 C12N C12P								
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched								
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) EPO-Internal, EMBL, BIOSIS, CHEM ABS Data, WPI Data, PAJ								
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <thead> <tr> <th style="text-align: left; padding: 2px;">Category</th> <th style="text-align: left; padding: 2px;">Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages</th> <th style="text-align: left; padding: 2px;">Relevant to claim No.</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td style="text-align: center; padding: 2px;">X</td> <td style="padding: 2px;"> DATABASE EMBL 'Online! Accession AE000383, 29 January 1997 (1997-01-29) BLATTNER F R ET AL: "Escherichia coli K-12 MG1655 section 273 of 400 of the complete genome." XP002162541 100% identity in a 1164 BP overlap between SEQ ID NO 58 (full length) and positions 5818-6981 of AE000383. The predicted amino acid sequences are identical. -/-/ </td> <td style="text-align: center; padding: 2px;">1-6</td> </tr> </tbody> </table>			Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.	X	DATABASE EMBL 'Online! Accession AE000383, 29 January 1997 (1997-01-29) BLATTNER F R ET AL: "Escherichia coli K-12 MG1655 section 273 of 400 of the complete genome." XP002162541 100% identity in a 1164 BP overlap between SEQ ID NO 58 (full length) and positions 5818-6981 of AE000383. The predicted amino acid sequences are identical. -/-/	1-6
Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.						
X	DATABASE EMBL 'Online! Accession AE000383, 29 January 1997 (1997-01-29) BLATTNER F R ET AL: "Escherichia coli K-12 MG1655 section 273 of 400 of the complete genome." XP002162541 100% identity in a 1164 BP overlap between SEQ ID NO 58 (full length) and positions 5818-6981 of AE000383. The predicted amino acid sequences are identical. -/-/	1-6						
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C. <input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.								
* Special categories of cited documents: *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance *E* earlier document but published on or after the international filing date *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed								
T later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art. *&* document member of the same patent family		Date of the actual completion of the international search 9 March 2001						
Date of mailing of the international search report 22/03/2001		Authorized officer Lejeune, R						
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5B18 Patentteam 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 apo nl Fax: (+31-70) 340-3016								

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Int'l. Appl. No.
PCT/US 00/22874

C (Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	BOUVET O M M ET AL: "Taxonomic diversity of anaerobic glycerol dissimilation in the Enterobacteriaceae." RESEARCH IN MICROBIOLOGY, vol. 146, no. 4, 1995, pages 279-290, XP000982719 ISSN: 0923-2508 the whole document	
A	SKRALY F A ET AL: "Construction and characterization of a 1,3-propanediol operon" APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY, US, WASHINGTON, DC, vol. 64, no. 1, January 1998 (1998-01), pages 98-105, XP002134649 ISSN: 0099-2240 the whole document	
X	WO 98 21341 A (DIAZ TORRES MARIA ;CHASE MATTHEW W (US); GENENCOR INT (US); TRIMBU) 22 May 1998 (1998-05-22) cited in the application examples 1-10 figure 1	25
Y	WO 99 28480 A (DU PONT ;NAIR RAMESH V (US); GENENCOR INT INC (US); PAYNE MARK S (U) 10 June 1999 (1999-06-10) cited in the application abstract	28
Y	WO 98 21339 A (DIAS TORRES MARIA ;HAYNIE SHARON LORETTA (US); HSU AMY KUANG HUA () 22 May 1998 (1998-05-22) cited in the application examples 1,2 page 23 page 27	28
1		

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (July 1992)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

Int'l. Jpn/ Application No
PCT/US 00/22874

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9821341 A	22-05-1998	AU 5248498 A AU 5507698 A BR 9712761 A CN 1239511 A CN 1244217 A EP 0942989 A EP 0946732 A WO 9821339 A US 6013494 A US 6136576 A ZA 9710194 A	03-06-1998 03-06-1998 26-10-1999 22-12-1999 09-02-2000 22-09-1999 06-10-1999 22-05-1998 11-01-2000 24-10-2000 12-05-1999
WO 9928480 A	10-06-1999	AU 1619199 A BR 9815361 A CN 1284132 T EP 1034278 A	16-06-1999 21-11-2000 14-02-2001 13-09-2000
WO 9821339 A	22-05-1998	AU 5248498 A AU 5507698 A BR 9712761 A CN 1239511 A CN 1244217 A EP 0942989 A EP 0946732 A WO 9821341 A US 6013494 A US 6136576 A ZA 9710194 A	03-06-1998 03-06-1998 26-10-1999 22-12-1999 09-02-2000 22-09-1999 06-10-1999 22-05-1998 11-01-2000 24-10-2000 12-05-1999

フロントページの続き

(51) Int. Cl. ⁷	識別記号	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 P	7/18	C 1 2 R	1:19
//(C 1 2 N	1/21		1:01
C 1 2 R	1:19)	C 1 2 R	1:145
(C 1 2 N	9/04		1:225
C 1 2 R	1:01)	C 1 2 R	1:66
(C 1 2 N	9/04		1:85
C 1 2 R	1:145)	C 1 2 R	1:645
(C 1 2 N	9/04		1:84
C 1 2 R	1:225)	C 1 2 R	1:72
(C 1 2 N	9/04		1:78
C 1 2 R	1:66)	C 1 2 R	1:785
(C 1 2 N	9/04		1:88
C 1 2 R	1:85)	C 1 2 R	1:07
(C 1 2 N	9/04		1:42
C 1 2 R	1:645)	C 1 2 R	1:465
(C 1 2 P	7/18		1:38
C 1 2 R	1:66)	C 1 2 N	15/00
(C 1 2 N	9/04		Z N A A
C 1 2 R	1:72)		
(C 1 2 N	9/04		
C 1 2 R	1:78)		
(C 1 2 N	9/04		
C 1 2 R	1:785)		
(C 1 2 N	9/04		
C 1 2 R	1:88)		
(C 1 2 N	9/04		
C 1 2 R	1:07)		
(C 1 2 N	9/04		
C 1 2 R	1:42)		
(C 1 2 N	9/04		
C 1 2 R	1:465)		
(C 1 2 N	9/04		
C 1 2 R	1:38)		
(C 1 2 N	9/04		
C 1 2 R	1:19)		
(C 1 2 P	7/18		
C 1 2 R	1:85)		
(C 1 2 P	7/18		
C 1 2 R	1:19)		
(C 1 2 P	7/18		
C 1 2 R	1:145)		
(C 1 2 P	7/18		
C 1 2 R	1:225)		
(C 1 2 P	7/18		
C 1 2 R	1:66)		
(C 1 2 P	7/18		

C 1 2 R 1:85)

(C 1 2 P 7/18

C 1 2 R 1:645)

(C 1 2 P 7/18

C 1 2 R 1:84)

(C 1 2 P 7/18

C 1 2 R 1:72)

(C 1 2 P 7/18

C 1 2 R 1:78)

(C 1 2 P 7/18

C 1 2 R 1:785)

(C 1 2 P 7/18

C 1 2 R 1:88)

(C 1 2 P 7/18

C 1 2 R 1:07)

(C 1 2 P 7/18

C 1 2 R 1:465)

(C 1 2 P 7/18

C 1 2 R 1:38)

(72)発明者 エンブテージ, マーク

アメリカ合衆国デラウェア州19810ウスル

ミントン・ランドンドライブ2822

(72)発明者 ハイニイエ, シヤロン

アメリカ合衆国ペンシルベニア州19106フ

イラデルフィア・スプルウストリート529

(72)発明者 ラフエンド, ライザ

アメリカ合衆国デラウェア州19703クレイ

モント・マウントバーノンドライブ2

(72)発明者 プシイ, ジエフ

アメリカ合衆国カリフォルニア州94303パ

ロアルト・ページミルロード925

(72)発明者 ホワイテツド, グレツグ

アメリカ合衆国カリフォルニア州ベルモン

ド・サウスロード304

F ターム(参考) 4B024 BA08 BA80 CA04 DA06 EA04

GA11 HA20

4B050 CC03 DD04 LL05

4B064 AC05 CA02 CA19 CA21 CC24

DA16

4B065 AA01X AA09X AA15X AA23X

AA26X AA29X AA41X AA46X

AA50X AA57X AA60X AA72X

AA73X AA76X AA77X AA79X

AB01 BA02 BB15 CA05 CA28

【要約の続き】

に改良された方法は、3-ヒドロキシプロピオンアルデヒドを1, 3-プロパンジオールに転換するのに十分な非-特異的触媒活性をコードする遺伝子がE. コリ中に存在することに頼っている。